

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:
IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE SUELOS DE LA
PROVINCIA DE PICHINCHA, CON CAPACIDAD DE PRODUCIR
ANTIBIÓTICOS DE AMPLIO ESPECTRO.

AUTORES:
JOSE ALEJANDRO NÚÑEZ REINOSO
CESAR DAVID SIERRA ARIAS

TUTORA:
MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ

Quito, febrero del 2018

Cesión de derechos de autor

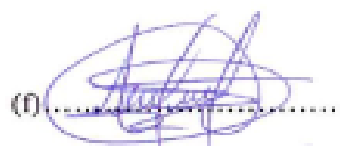
Nosotros, José Alejandro Núñez Reinoso y Cesar David Sierra Arias con documentos de identificación N.º 1725374456 y 1717996779 respectivamente, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: "Identificación de microorganismos de suelos de la provincia de pichincha, con capacidad de producir antibióticos de amplio espectro", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



José Alejandro Núñez Reinoso

C.C.: 1725374456



Cesar David Sierra Arias

C.C.: 1717996779

Quito, febrero del 2018

Declaratoria de coautoría de la docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
“Identificación de microorganismos de suelos de la provincia de pichincha, con capacidad de producir antibióticos de amplio espectro”, realizado por José Alejandro Núñez Reinoso y Cesar David Sierra Arias, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero del 2018

(f) 

María Elena Maldonado Rodríguez

C.C.: 1707743157

Dedicatoria

Este trabajo se la dedico a mi padre Alejandro y a mi madre Noemí, por darme su apoyo incondicional durante toda mi vida, ya que, a pesar de las dificultades, siempre supieron aconsejarme y creer en mí. A mis hermanos Santiago, Lorena y Juan, porque siempre pude, puedo y podré contar con ellos en las buenas como en las malas. A todos mis amigos que estuvieron ahí, para hacer mi vida más plena y llevadera, compartiendo juntos de aventuras, conocimiento y apoyo total.

Acepta la responsabilidad de tu vida. Date cuenta que tú eres quien va a llegar a donde quiere ir, nadie más. Les Brown

José Alejandro Núñez Reinoso

La presente investigación se la dedico a mi madre Sandra por su paciencia, apoyo incondicional y ayuda con los recursos necesarios para estudiar, a mi padre Nelson por estar presente día a día, a mi familia por su generosa ayuda, consejos y enseñanzas. A la Dra. María Elena Maldonado por su paciencia y motivación para hacer las cosas bien, y a mis amigos que han estado constantemente. Me han dado todo lo que soy como persona, valores, principios, perseverancia para conseguir mis objetivos.

Establecer metas es el primer paso en volver lo invisible en visible. Anthony Robbins

Cesar David Sierra Arias

Índice de contenido

Introducción	1
1. Marco teórico	3
1.1. Microorganismos de interés en la producción de antibióticos.	3
1.1.1. Microorganismos del suelo	3
1.2 Metabolismo microbiano	4
1.2.1 Metabolitos primarios	5
1.2.2 Metabolitos secundarios	5
1.3 Antibióticos	6
1.3.1 Clasificación de los antibióticos	7
1.3.2 Resistencia a antibióticos	9
1.4 Aislamiento bacteriano	10
1.4.1. Técnicas de aislamiento	10
1.5 Identificación de bacterias	11
1.5.1 Tinción de Gram	12
1.5.2 Fundamento de la tinción de esporas	13
1.5.3 Caracterización macroscópica en bacterias	13
1.5.4 Pruebas bioquímicas	14
1.6. Pruebas de antibiograma	16

1.6.1 Bacterias usadas en pruebas de antibiograma.....	16
1.7 Variables que influyen en la producción de antibióticos.....	18
1.7.1 Salinidad	18
1.7.2. pH.....	19
1.8 Medios de cultivo empleados para la producción de antibióticos.....	19
1.8.1 Medio ISP2	20
1.8.2 Medio antibiótico N°5.....	20
2. Metodología.....	22
2.1 Muestras para identificación	22
2.2 Aislamiento de microorganismos del suelo.....	22
2.2.1 Factores de dilución	22
2.2.2 Siembra de las diluciones preparadas.	22
2.2.3 Selección de microorganismos	23
2.3 Pruebas de antibiosis	23
2.3.1 Medios de cultivo para pruebas de antibiosis	23
2.3.1.1 Elaboración de agar nutriente	23
2.3.1.2 Elaboración del medio ISP2	23
2.3.1.3 Elaboración del medio antibiótico N°5.....	24
2.3.2 Cepas productoras de antibióticos	24
2.3.3 Aislamiento de microorganismos con capacidad antibiótica.....	26
2.4 Cepario	26
2.5 Identificación de microorganismos seleccionados.	26

2.5.1 Pruebas macroscópicas	26
2.5.2 Tinción de Gram	27
2.5.3 Tinción de esporas	27
2.5.4 Prueba de catalasas	28
2.5.5 Prueba de oxidasa	28
2.5.6. Prueba de anaerobiosis.....	29
2.5.7 Prueba de Manitol.....	29
2.5.8 Pruebas con kit de Identificación bioquímico.....	30
2.5.8.1 BD BBL™ Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID Kit	30
2.5.8.2 Microgen® BACILLUS-ID	30
2.6 Producción de la sustancia antibiótica en condiciones de estrés	31
2.6.2 Siembra del preinóculo variando la salinidad y pH.	31
2.6.3 Método de perforación en placa.....	32
2.7 Análisis estadístico	33
3. Resultados y discusión.....	34
3.1. Aislamiento de microorganismos del suelo.....	34
3.2. Pruebas de antibiosis	34
3.3. Caracterización morfológica de los microorganismos.	34
3.4. Pruebas con kits de Identificación bioquímica.	35
3.5 Evaluación de la producción de antibiótico en condiciones de estrés.....	39
3.6 Análisis del Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis (ABCPA) por tratamientos. Prueba de Tukey (5%)	42

3.6.1 ABCPA en <i>Bacillus spizizenii</i>	42
3.6.2 ABCPA en <i>Pseudomona aeruginosa</i>	43
Conclusiones	45
Recomendaciones.....	46
Referencias.....	47

Índice de figuras

Figura 1 Esquema de siembra con palillos.....	24
Figura 2 Resultado estadístico de <i>Bacillus megaterium</i> con un 99.09% de confianza	37
Figura 3 Resultado estadístico de <i>Bacillus megaterium</i> con un 83.84% de probabilidad	38
Figura 4 Área de los halos de inhibición de la cepa PAP48G3 contra <i>Bacillus spizizenii</i> a 35°C en los diferentes tratamientos.	40
Figura 5 Área de los halos de inhibición de la cepa PAP48G3 contra <i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> a 35 °C en los diferentes tratamientos	41
Figura 6 Área bajo la curva del progreso de antibiosis contra <i>Bacillus spizizenii</i>	43
Figura 7 Área bajo la curva del progreso de antibiosis, contra <i>Pseudomona aeruginosa</i>	44

Índice de tablas

Tabla 1 Preparación de Estándares de McFarland	25
Tabla 2 Producción del antibiótico	32
Tabla 3 Caracterización morfológica de los microorganismos productores de antibióticos.....	35
Tabla 4 Características y pruebas bioquímicas para la cepa PAP48G3	36

Índice de anexos

Anexo 1 Cepa PAP48G3 en Agar Nutriente.....	57
Anexo 2 Colonias aisladas de la cepa PAP48G3 en Agar Nutriente	57
Anexo 3 Prueba de antibiosis contra <i>Bacillus spzzizenii</i>	58
Anexo 4 Prueba de antibiosis contra <i>Pseudomona aeruginosa</i>	58
Anexo 5 Tratamientos con pH y salinidad variable	59
Anexo 6 Método de perforación en placa. Inhibición de <i>Bacillus megaterium</i> contra <i>Bacillus spzzizenii</i> en el día 4 con 1,2% de salinidad y pH=7	59
Anexo 7 Método de perforación en placa. Inhibición de <i>Bacillus megaterium</i> contra <i>Bacillus spzzizenii</i> en el día 3 con 1,2% de salinidad y pH=7	60
Anexo 8 Método de perforación en placa. Inhibición de <i>Bacillus megaterium</i> contra <i>Bacillus spzzizenii</i> en el día 4 con 0,7% de salinidad y pH=7.	60
Anexo 9 Prueba de catalasa positiva.....	61
Anexo 10 Prueba de Manitol positiva.....	61
Anexo 11 kit BD BBL CRYSTAL revelado bajo luz UV	62
Anexo 12 kit BD BBL CRYSTAL Lectura del kit a las 24 horas	62
Anexo 13 Código resultante del kit BD BBL CRYSTAL	63
Anexo 14 Resultados de las Pruebas realizadas con el kit Microgen <i>Bacillus ID</i>	63
Anexo 15 Tinción Gram PAP48G3 100x	64

Resumen

Los microorganismos han adquirido resistencia a diversas sustancias antibióticas por su capacidad de generar diferentes mecanismos de adaptación en condiciones de estrés, debido al mal empleo de sustancias antimicrobianas. La resistencia a estas sustancias ha aumentado en todo el mundo, provocando índices de mortalidad muy altas; razón por la cual es muy importante la investigación de nuevas sustancias antibióticas, que pueden ser obtenidas a partir de metabolitos secundarios, formadas por microorganismos provenientes del suelo.

La investigación experimental se basó en la aplicación de técnicas de sensibilidad bacteriana, para obtener bacterias capaces de producir sustancias antibióticas, las mismas que se las aisló y se las identificó con diversas pruebas bioquímicas y análisis morfológicos. Se pudo determinar que la única bacteria que presentó actividad antimicrobiana fue: *Bacillus megaterium* (PAP48G3). Con esta cepa se analizó la capacidad de producir antibióticos, en condiciones que involucran variación en salinidad y pH en medios de cultivo, frente a *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus spizizenii*. Se determinó que esta bacteria produce mayor actividad antimicrobiana contra *Pseudomona aeruginosa* en un caldo de cultivo ISP2 hipersalino (1.2%) y con un rango de pH 7 en el día 3. Esta bacteria también produce mayor actividad antimicrobiana contra *Bacillus spizizenii* en un caldo de cultivo ISP2 hipersalino (1.2%) y con un rango de pH 7 en el día 4.

Palabras clave: antibiograma, estrés, antibióticos, *Bacillus megaterium*

Abstract

The microorganisms have acquired resistance to various antibiotic substances due to their ability to generate different adaptation mechanisms in stress conditions due to the misuse of antimicrobial substances. Resistance to these substances has increased throughout the world, causing very high mortality rates; that's why, it is very important to research new antibiotic substances, which can be obtained from secondary metabolites, formed by microorganisms from the soil.

The experimental research was based on the application of bacterial sensitivity techniques, to obtain bacteria capable of producing antibiotic substances, the same ones that were isolated and identified with various biochemical tests and morphological analyzes. It was determined that the only bacteria that showed antimicrobial activity was: *Bacillus megaterium* (PAP48G3). With this strain, the ability to produce antibiotics was analyzed, under conditions that involve variation in salinity and pH in culture media, against *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus spizizenii*. It was determined that this bacterium produces greater antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* in a culture broth hypersaline ISP2 (1.2%) and with a range of pH 7 on day 3. This bacterium also produces greater antimicrobial activity against *Bacillus spizizenii* in a culture broth Hypersaline ISP2 (1.2%) and with a pH 7 range on day 4.

Key words: antibiogram, stress, antibiotics, *Bacillus megaterium*

Introducción

El suelo es un lugar donde habitan toda clase de microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras, capaces de producir metabolitos de interés. Una de las sustancias más importantes y más investigadas en las últimas décadas son los antibióticos, que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y que funcionan como reguladores de poblaciones microbianas en el suelo, el compost, aguas residuales, etc. (Sethi, Kumar, & Gupta, 2017). Estos son compuestos antimicrobianos producidos por diversos organismos vivos y han sido usados de forma terapéutica y profiláctica para el control de enfermedades infecciosas (Bathia, 2005).

Los microorganismos productores de estas sustancias se obtienen de suelos, aguas y otros hábitats naturales (Sethi, Kumar, & Gupta, 2017). De los más de 4000 antibióticos que se han logrado aislar de diversos microorganismos como bacterias u hongos filamentosos, solo 50 pudieron tener un uso adecuado en diferentes enfermedades. Los demás compuestos no han sido útiles, debido a la toxicidad que se produce en humanos, animales o plantas, y los costos de producción son demasiado elevados (Bathia, 2005).

En los últimos 40 años, el uso creciente de antibióticos ha aumentado el número de bacterias resistentes a estas sustancias, que provocan un incremento en los costos de salud, al no tratar de forma eficaz una infección (Millar, 2013). El mundo está destinado a una era postantibiótica, donde las infecciones y lesiones tratadas antes fácilmente con antibióticos convencionales, volverían a tener un alto índice de mortalidad (Organización Mundial de la Salud, 2014). La presente investigación se fundamenta en la identificación de microorganismos de suelos de la provincia de

Pichincha en Ecuador, con capacidad antibiótica frente a *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) y contra *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027), en las siguientes condiciones de estrés: variando las concentraciones de NaCl y pH en los medios, donde se encuentran las bacterias de interés, para estimar las condiciones ideales para producir la sustancia antibiótica.

Capítulo 1

1. Marco teórico

1.1. Microorganismos de interés en la producción de antibióticos.

La resistencia de las bacterias es cada vez más grande hacia los compuestos antibacterianos, por ello existe la necesidad de encontrar nuevos microorganismos productores de antibióticos. Gracias a Fleming por el descubrimiento de la penicilina, se puso más énfasis en el uso de los antibióticos. En la actualidad se han descubierto alrededor de 6000 microorganismos capaces de producir algún tipo de antibiótico, de los cuales los más conocidos son los β lactámicos como: las penicilinas y cefalosporinas.

Los principales antibióticos obtenidos a partir de microorganismos son: Penicilina (*Penicillium chrysogenum*), Cefalosporina (*Cephalosporium acremonium*), Bacitracina (*Bacillus subtilis*), Polimixina B (*Bacillus polymyxa*), Anfotericina B (*Streptomyces nodosus*), Eritromicina (*Streptomyces erythreus*), Neomicina (*Streptomyces fradiae*), Streptomycina (*Streptomyces griseus*), Tetraciclina (*Streptomyces rimosus*), Vancomicina (*Streptomyces orientalis*), Gentamicina (*Micromonospora purpurea*), Rifampicina (*Streptomyces mediterranei*), Griseofulvina (*Penicillium griseofulvum*) (ArgenBio, 2007).

1.1.1. Microorganismos del suelo

Los microorganismos del suelo utilizan la materia orgánica o mineral como fuente de energía y nutrientes, son considerados los más abundantes, clasificándose en: aerobios,

anaerobios, facultativos (crecen con o sin oxígeno), acidófilos, basófilos, neutrófilos, heterótrofos y autótrofos. Si soportan temperaturas entre los 15° a 40 °C se los denomina mesófilos, los que crecen a temperaturas menores a 15°C son psicrofilos y temperaturas mayores a 40° son termófilos. El suelo ideal para el crecimiento de microorganismos es aquel que contiene una estructura con buena circulación de aire y agua. La mayor concentración de microorganismos se la encuentra en la rizósfera, ya que constituye entre el 10 y el 50% de energía. Los microorganismos con capacidad de producir antibióticos se los puede encontrar en diferentes tipos de suelos y en una concentración muy alta debido a su alto nivel de nutrientes, humedad relativamente alta (92%) y temperatura que rodee los 28°C (García F. , 2011).

1.2 Metabolismo microbiano

Se denomina metabolismo microbiano al conjunto de procesos por los cuales un microorganismo obtiene la energía y los nutrientes necesarios para vivir y reproducirse. Involucra reacciones químicas que se dan en la célula, para obtener energía química del entorno, transformar los nutrientes exógenos en componentes macromoleculares de la célula y degradar moléculas necesarias para funciones específicas. El metabolismo está conformado por medio de secuencias de reacciones catalizadas enzimáticamente. Cuando la célula sintetiza sus componentes, el proceso se denomina anabolismo. Cuando se producen reacciones degradativas de nutrientes para adquirir energía, el proceso se denomina catabolismo. Debido a estas dos transformaciones químicas que ocurren simultáneamente, se da el metabolismo. La energía liberada por las reacciones de óxido-reducción del catabolismo debe ser almacenada y transformada; para esto se lo realiza mediante la unión de fosfato de alta

energía, por medio de la fosforilación a nivel del sustrato y fosforilación oxidativa. En el metabolismo se pueden dar dos tipos de metabolitos: primarios y secundarios. (Varela G. , 2015).

1.2.1 Metabolitos primarios

Tienen una distribución amplia y se producen mediante vías biosintéticas simples. Están involucrados en procesos de degradación de moléculas productoras de energía, así como también la síntesis de compuestos químicos. Su constitución química es más simple y tienen lugar en el organismo que sintetiza mediante todo su ciclo de vida (González, Basílico, & Sarsotti, 1997). Los metabolitos primarios son aminoácidos, nucleótidos y lípidos que conforman un conjunto de reacciones, donde el nitrógeno, el carbono y la energía determinan el funcionamiento de los organismos. (Ávalos & Pérez, 2009). Los metabolitos primarios han sido usados industrialmente para elaborar ácidos orgánicos, solventes y vitaminas. Se elaboran por fermentación microbiana, ya que son procesos más económicos, sin la utilización de muchas sustancias químicas.

1.2.2 Metabolitos secundarios

Su producción comienza en la fase estacionaria, cuando el crecimiento de la biomasa bacteriana se detiene, dando como resultado la trofofase (proliferación celular) y la ideofase (no hay proliferación celular). Pueden ser producidos por vías biosintéticas primarias, tienen una estructura química diversa, que pueden actuar en la supervivencia celular cuando hay competencia y eliminar a los demás

microorganismos, formándose cuando entra a un estado de estrés. (González, Basílico, & Sarsotti, 1997).

El metabolismo secundario son procesos metabólicos que se dan después de la fase de crecimiento, por medio de vías biosintéticas que no tienen funciones de reserva o de estructura. Estos metabolitos no son necesarios en la biosíntesis celular y no juegan un papel directo con el metabolismo energético. Algunas de estas sustancias, como por ejemplo los antibióticos, son útiles para los organismos, ya que inhiben el crecimiento de otros organismos de su entorno.

1.3 Antibióticos

Los antibióticos son sustancias producidas mediante un organismo que tiene la capacidad de inhibir el desarrollo de otro microorganismo o eliminarlo de manera completa. Hasta ahora se han descubierto más de 4000 sustancias antibióticas, de las cuales 2400 provienen de microorganismos.

Los antibióticos constituyen un grupo muy amplio de componentes con distinta función farmacocinética y farmacodinámica, que tienen un comportamiento puntual sobre una estructura, con un alto potencial biológico a menor concentración (Korolkovas & Burckhalter, 2003). Un microorganismo podría atacar a otro, a través de la producción de metabolitos secundarios volátiles, enzimas hidrolíticas y moléculas tóxicas pequeñas (Michel, 2001). Estos metabolitos actúan generalmente en concentraciones bajas y pueden provocar un efecto contraproducente a uno o más microorganismos.

Los antibióticos tienen la capacidad de afectar el crecimiento de las células de los microorganismos susceptibles (Robles, 2014). Aquellos antibióticos que poseen un amplio espectro de actividad y actúan contra bacterias Gram negativas y Gram positivas se los denomina de amplio espectro. Un ejemplo de estos son los Carbapenémicos, que también actúan sobre un amplio número de géneros y especies diferentes, entre las cuales se encuentran *Pseudomonas* y *Enterobacterias*, sin embargo, existen algunos microorganismos capaces de producir Carbapenemasas que los hace resistentes a todos los β lactámicos (Vignoli, 2015).

1.3.1 Clasificación de los antibióticos

1.3.1.1 Según la estructura química de los antibióticos

Betalactámicos: Poseen el anillo betalactámico que se compone de 3 átomos de carbono y un átomo de nitrógeno como, por ejemplo: Penicilinas, Clavamas, Cefalosporinas, Monobactámicos y Carbapenemas

Aminoglicósidos: Contienen azúcares aminados y un anillo llamado aminociclitol. Un ejemplo de estos antibióticos es la Estreptomicina.

Macrólidos: Contienen un anillo lactónico con azúcares aminados. Un ejemplo es la Eritromicina, producida por *Streptomyces*.

Tetraciclinas: Contienen en su estructura cuatro anillos, conocido como el anillo naftaleno.

Polipeptídicos: Poseen una cadena de aminoácidos, por ejemplo: Poliximina B que es producida por *Bacillus polymyxa* (Mateos, 2005).

1.3.1.2. Según su mecanismo de acción

Es el mecanismo mediante el cual el antibiótico puede inhibir el crecimiento o eliminar a la célula bacteriana. Se los puede clasificar como:

Inhibidores de la pared celular: Son considerados agentes bactericidas. Actúan en la biosíntesis del peptidoglucano, la cual es indispensable para la supervivencia de las bacterias. El daño se produce debido a la pérdida de la rigidez de la célula bacteriana que puede provocar la muerte celular como por ejemplo los más importantes son las Penicilinas y Cefalosporinas (Molina, 2011).

Antibióticos que afectan a la membrana citoplasmática: Mediante los inhibidores de bacterias Gram negativas se desintegra la membrana citoplasmática, donde los cationes salen de la célula bacteriana (Molina, 2011). Los antibióticos actúan modificando la membrana celular y provocan una alteración sobre los fosfolípidos de la membrana celular. Unos ejemplos de estos antibióticos son: Polienos y las Polimixinas (Basualdo & Coto, 2007).

Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos: Estos agentes antimicrobianos no permiten la síntesis de nucleótidos, interfiriendo con las polimerasas en la replicación y en la transcripción del ADN (Molina, 2011). Algunos ejemplos son las Quinolonas (Cinoxacina, Ofloxacina, Pefloxacina) y Nitroimidazoles (Ornidazol, Secnidazol, Metronidazol) (Basualdo & Coto, 2007).

Inhibidores de la función ribosomal: Los ribosomas están conformados por dos subunidades 30S y 50S, que constituyen el lugar donde actúan los agentes microbianos

producen proteínas ejemplo la Eritromicina, Oleandomicina, Tilosina, etc. (Molina, 2011).

1.3.2 Resistencia a antibióticos

Las bacterias pueden desarrollar distintos mecanismos de resistencia, que consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos. Las cepas resistentes se vuelven dominantes por la presión selectiva de los antibióticos que hacen desaparecer a las bacterias sensibles. Debido a su alta capacidad de adaptación, puede existir una resistencia natural en las bacterias, si carecen del sitio diana para un antibiótico, como, por ejemplo: la falta de pared en el *Mycoplasma*, en relación con los betalactámicos. En los Gram positivos pueden ser: plasmídicas, inducibles y extracelulares. En las Gram negativas pueden ser: de origen plasmídico o de transposones; cambios en la permeabilidad de membrana (Tetraciclina, Cloranfenicol), enzimas que destruyen al antibiótico (Betalactamasas, Cefalosporinasas), alteración del receptor del antibiótico (Proteínas de unión a la Penicilina), y metilación enzimática del RNA 23S (Eritromicina y Lincomicina). Una bacteria puede generar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antibióticos; de igual manera un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de resistencia. (Molina, 2011)

Desde el punto de vista clínico, el mayor problema es la multirresistencia, que conlleva a la limitación de fármacos a utilizar quedando restringido el uso de Vancomicina o Rifampicina, que pueden resultar favorables en el control de infecciones producidas por cepas de *S.aureus* resistentes a Meticilina. (Pérez, 2016)

1.4 Aislamiento bacteriano

La técnica que permite obtener un cultivo puro es el aislamiento bacteriano, que consiste en separar diversas especies existentes en la población microbiana. Esta técnica permite realizar estudios morfológicos, bioquímicos o de identificación, mediante distintas técnicas de siembra, para conservar su crecimiento y actividad en un medio de cultivo (Volke & Lilia, 2012).

1.4.1. Técnicas de aislamiento

Para aislar un microorganismo existen diversas técnicas de siembra como: método de siembra por estría en placa y método de siembra en superficie o siembra en placa. Para el aislamiento de microorganismos a partir de muestras naturales, se utiliza comúnmente la siembra por estría en placa en un cultivo sólido (Volke & Lilia, 2012).

1.4.1.1. Método de siembra por estría en placa

Esta técnica permite obtener cultivos puros, para determinar el tipo de microorganismo que se va a estudiar. Mediante un asa de siembra se va a direccionar en sentido de estriado, con la finalidad de que el cultivo vaya diluyendo el número de células cada vez más, para que se generen distintas unidades formadoras de colonias (UFC), hasta obtener un cultivo puro (Volke & Lilia, 2012).

1.4.1.2. Método de siembra en superficie o siembra en placa

Esta técnica permite sembrar desde 0.1mL del inóculo y se homogeniza con el asa de Digrafsky con el fin de obtener el recuento de microorganismos viables, es decir, los microorganismos crecen en la superficie del agar (Bermúdez, 2008).

1.5 Identificación de bacterias

La clasificación de las bacterias se basa en el análisis morfológico y bioquímico. Su morfología puede variar dependiendo de su estructura (bacilos con una forma alargada y los cocos con una forma redondeada); sin embargo, existen también bacterias pleomórficas, que pueden variar de tamaño y forma con el transcurso de su ciclo de vida. En las bacterias aerobias, el oxígeno es el compuesto responsable de aceptar electrones mientras que, en bacterias anaerobias los aceptores son compuestos inorgánicos tales como: nitratos, manganeso oxidado, carbonatos, etc. (Zambrano, 2013).

Para poder aislar y seleccionar bacterias de interés exitosamente, se debe escoger métodos fiables de carácter interdisciplinario, que incluya actividades de identificación bioquímica, morfológica y genética (Espinell, 2016).

1.5.1 Tinción de Gram

La tinción es una técnica en la que las moléculas de un colorante se pueden adsorber en una superficie. La observación en el microscopio se da por el cambio de color en las células de un microorganismo, con el uso de diferentes colorantes que se adhieren a un organismo.

La técnica de tinción Gram fue desarrollada por el bacteriólogo Christian Gram en 1844. Él supo mencionar que las bacterias pueden teñirse de forma diferente, debido a la distinta estructura de sus paredes celulares. De acuerdo a esta técnica de tinción, las bacterias pueden clasificarse en Gram positivas y Gram Negativas.

El fundamento de esta técnica consiste en la capacidad de retención del colorante Cristal Violeta en la pared celular. Las bacterias Gram positivas poseen una capa gruesa compuesta entre 80 y 90% de peptidoglicano en su pared celular y provoca la retención de mayor cantidad de reactivo Cristal Violeta en sus células. Las bacterias Gram negativas poseen entre 10 y 20% de peptidoglicano y no son capaces de retener el Cristal Violeta. Otro reactivo importante en esta técnica es el Lugol, que actúa como mordiente, haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana. Por otro lado, el alcohol-acetona sirve para la decoloración de las bacterias que son Gram negativas. La Safranina que es de color rojo, sirve para poner de manifiesto una bacteria Gram negativa. Las bacterias Gram positivas que adsorbieron más Cristal Violeta, se tornan de color azul. En el caso de las bacterias Gram negativas que son casi incoloras, debido a la poca adsorción de Cristal Violeta, las células se tornan de color rojo.

La tinción Gram es utilizada en los laboratorios para la identificación preliminar de una bacteria y para el control de calidad de técnicas de aislamiento bacteriano. Es el

proceso previo para saber qué kit de identificación bioquímico usar, para el reconocimiento de una bacteria de interés. (Santambrosio, Ortega, & Garibaldi, 2009).

1.5.2 Fundamento de la tinción de esporas

Las esporas son células encontradas en reposo, que se forman en el interior de células vegetativas por procesos de división especiales, que se liberan de éstas por lisis celular, cuando la espora madura.

Estas son capaces de refractar la luz, ya que tienen una pared gruesa y un contenido bajo de agua en la célula en la que se encuentra encerrada. Las esporas están formadas de una corteza o córtex, constituida en su mayoría por peptidoglucano. Fuera de esta corteza, poseen una cubierta formada por proteínas con cisteína y también aminoácidos hidrofóbicos, que le permiten ser impermeables a ciertas sustancias como el octanol, cloroformo, etc.

La coloración de las esporas se fundamenta en los colorantes que pueden penetrar su pared celular. Dado que la pared de las esporas es casi impermeable, si se calienta el preparado, el colorante es capaz de atravesar la pared y la poca permeabilidad es la característica que previene la decoloración para la observación en el microscopio. La interpretación se basa en el color. Las esporas darán un color verde y los bacilos darán color rojo (Díaz & Gamazo, 2005).

1.5.3 Caracterización macroscópica en bacterias

Para poder diferenciar la morfología de diversas colonias de bacterias, es necesario analizar estas características en cultivos frescos. Cuando se siembra y se aísla una bacteria en condiciones favorables se pueden destacar características tales como el

tamaño, color, consistencia y su forma. El tamaño es uniforme entre colonias bacterianas de un mismo espécimen (Rosas, 2015).

La forma puede ser analizada por el borde, ya sea liso, rugoso o irregular; y por el grosor que podría ser abultado o plano. En la textura podría variar entre seca o viscosa y con superficie granular o lisa.

La coloración es una de las características que permiten al investigador identificar de manera más sencilla a una bacteria. Un ejemplo claro es la *Serratia marcescens* que posee un pigmento rojo, o también la *Pseudomona aeruginosa* que tiene pigmento verde (Fernandez, García, Sáez, & Valdezate, 2010).

1.5.4 Pruebas bioquímicas

Los seres vivos son capaces de generar un sinnúmero de reacciones químicas. A este conjunto de reacciones se le denomina “Metabolismo”. Las enzimas son las encargadas de catalizar las diferentes reacciones metabólicas; estas pueden ser intracelulares o extracelulares.

Hay muchas pruebas bioquímicas donde se usan medios de cultivo para analizar las diversas actividades metabólicas de un microorganismo. Las reacciones que se realizan más a menudo son: capacidad fermentadora en carbohidratos (sacarosa, lactosa, glucosa), en el que el medio TSI es muy usado para la identificación de Enterobacterias. Otras reacciones usadas es la capacidad catabólica en aminoácidos y urea y la capacidad de producir enzimas hidrolíticas intracelulares, extracelulares, oxidasas, lipasas, reductasas, amilasas, etc (Aquiahuatl, y otros, 2012).

Las pruebas bioquímicas son de gran importancia en la identificación de bacterias, ya sea en el ámbito ambiental, de alimentos o clínico. Estas pruebas mantienen los sistemas de evaluación convencionales, pero se realizan de manera mucho más rápida y segura. A continuación, se menciona algunas de las pruebas que más se utilizan en el laboratorio para identificar bacterias:

Prueba de catalasa: La catalasa es una enzima que se encuentra en aquellos microorganismos que tienen citocromo C. Las bacterias que son capaces de sintetizar catalasa pueden hidrolizar el agua oxigenada en oxígeno gaseoso y agua, formando burbujas en la reacción (Olmos, García, Sáez, & Valdezate, 2010).

Prueba de oxidasa: Sirve para detectar si una bacteria posee citocromo c en su cadena respiratoria. La reacción de la oxidasa se produce cuando el sistema citocromooxidasa activa la oxidación de citocromo dentro de la célula bacteriana, produciendo agua o peróxido de hidrógeno, dependiendo de la especie bacteriana. Generalmente se usa un papel que contiene el reactivo N, N, N', N' –tetrametil-p-dihidrocloreofenilendiamina. Si la coloración se torna azul, el resultado es positivo (Perilla, y otros, 2003).

Pruebas con kit de Identificación bioquímica – Son un conjunto de celdillas que tienen un sustrato liofilizado para inocularlos de manera individual. Estas celdillas permiten realizar entre 10 y 50 pruebas bioquímicas de forma simultánea y los resultados se expresan numéricamente. Cada especie tiene un código numérico que es ingresado en un software para dar a conocer la especie analizada. Aunque el fundamento de estos sistemas es el mismo, el número y pruebas que se realizan es diferente, debido a que su selección se relaciona con la actividad metabólica del microorganismo de interés. (Aquihuatl, y otros, 2012).

1.6. Pruebas de antibiograma

El objetivo principal de las pruebas de antibiograma es predecir cómo va a reaccionar una cepa bacteriana, al estar en contacto con un antibiótico. Pueden existir dos tipos de resultados: Sensibles o resistentes. Un resultado sensible demuestra que hay una probabilidad muy alta que la bacteria pueda ser eliminada por el antibiótico. Por otro lado, si el resultado es resistente, la bacteria no podrá ser eliminada por el antibiótico puesto a prueba.

Las pruebas de antibiograma son técnicas que ayudan a predecir un espectro antibiótico; pero hay otros tipos de factores tales como: derivados que se dan en la preparación de un antibiótico, la dosificación y la respuesta inmune, en las que estas pruebas no tienen utilidad alguna.

Existen tres factores que hay que controlar en las pruebas de antibiograma: el medio de cultivo dependiendo de la metodología que se vaya a usar, el antibiótico que se va a aplicar (amplio o mediano espectro) y la cepa bacteriana que se desea ensayar (Herrera, 2004).

1.6.1 Bacterias usadas en pruebas de antibiograma

En las pruebas de antibiograma, existen muchos agentes microbianos que se siguen usando de manera empírica, ya que este tipo de agentes no han mostrado resistencia a antibióticos. Es por eso que algunas especies de bacterias son de gran relevancia en el uso de pruebas de sensibilidad.

Este tipo de especies bacterianas no poseen una sensibilidad predecible, razón por la cual, son muy importantes en este tipo de pruebas. Entre los microorganismos más importantes se pueden destacar: miembros de la familia Enterobacteriaceae, *Enterococcus sp*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus sp* y *Bacillus sp* (Herrera, 1999).

1.6.1.1. *Bacillus spizizenii*

Es una subespecie de la especie *Bacillus subtilis*. Este organismo se aisló del Océano Índico y proviene de sedimentos hallados a 608 metros de profundidad.

B. subtilis subsp. spizizenii no ha sido catalogado como agente patógeno para el ser humano; no obstante, este organismo es capaz de contaminar alimentos, sin causar intoxicación alimentaria (Coronel, 2014).

Algunos usos que se destacan de esta bacteria son: la confirmación de calidad de medios de cultivo, evaluar el rendimiento de ensayos de laboratorio y ratificar procedimientos microbiológicos; entre ellos, la prueba de sensibilidad (Ñacato & Valencia, 2016).

1.6.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Es el patógeno más importante de la familia Pseudomonadaceae. Es un bacilo Gram negativo, curvado de forma ligera y aerobio. Posee un color azul verdoso, debido a pigmentos fluorescentes, tales como la pioverdina, piocianina, piomelanina y piorrubina (Montero, 2012).

Pseudomona aeruginosa es capaz de sobrevivir en ambientes adversos y es resistente a muchos agentes antimicrobianos. Adicional a su resistencia intrínseca, esta especie es capaz de obtener material genético exógeno y muta a nivel cromosómico fácilmente (Acosta, 2014).

Se han realizado pruebas de antibiograma para *Pseudomona aeruginosa* con algunos antibióticos y posee niveles de resistencia muy alta. Algunos antibióticos evaluados fueron la Amikacina (6.9% de resistencia), Ácido Nalidixico (74.5%), TMS (83.4%) y Nitrofurantoina (100%) (Varela C. , 2008).

1.7 Variables que influyen en la producción de antibióticos

La composición del medio, junto a la eficacia metabólica del microorganismo, incide de manera considerable en la biosíntesis de antibióticos (Hassan, El-Naggar, & Said, 2001). Se ha demostrado que la producción de metabolitos secundarios está directamente relacionada con la limitación de nutrientes del medio empleado; ya sean micronutrientes, macronutrientes, vitaminas, condiciones de salinidad, de pH, de temperatura, etc. (Chandrashekhara, 2010).

1.7.1 Salinidad

La producción de antibióticos puede aumentar, si se varía la concentración de sal en el medio de cultivo, debido al estrés que se produce en la célula bacteriana al cambiar su presión osmótica (Ripa, Nikkon, Zaman, & Khondkar, 2009). En este caso, la célula necesita de una gran energía de activación para producir “osmolitos”, que son sustancias orgánicas que le permiten al organismo adaptarse a bajos niveles osmóticos, influyendo en la mayor producción de metabolitos secundarios (Yan, 2014).

Los microorganismos pueden adaptarse a la salinidad, gracias al peptidoglicano de su pared celular, que les da resistencia y tolerancia osmótica. También estimula la quimiotaxis, que es un fenómeno que les permite a las bacterias dirigirse hacia lugares donde existen más nutrientes y menos elementos tóxicos (Borraz, 2006).

1.7.2. pH

El pH en medios de cultivo es considerado como uno de los factores medioambientales esenciales en la producción de antibióticos, debido al efecto que tiene sobre la actividad de una gran variedad de enzimas, que se encargan de catalizar reacciones metabólicas. Las bacterias tienen un crecimiento homogéneo y sin variaciones considerables, en un rango de pH entre 6.5 y 8. Este factor tiene influencia sobre algunos fenómenos fisiológicos complejos, tales como la permeabilidad de la membrana y la morfología celular (Guimaraes, y otros, 2004).

Los microorganismos dependen del equilibrio del pH. Esto se debe a que la mayoría de proteínas poseen diferentes rangos de pH para su función. Además, la concentración de protones en el medio está relacionada directamente con la bioenergética celular (Krulwich, Sachs, & Padan, 2011).

1.8 Medios de cultivo empleados para la producción de antibióticos

Para obtener resultados fiables en ensayos microbiológicos de antibióticos, es necesario estandarizar los medios de cultivo empleados y condiciones de pH, salinidad, temperatura, etc. Elegir un medio de cultivo adecuado es el principio fundamental para poder reproducir los análisis a realizar y tener resultados confiables

(Ramirez & Marin, 2009). Hay algunos compuestos importantes en el uso microbiológico para la producción de antibióticos. Son sustancias que le proveen a las bacterias de los minerales necesarios para su crecimiento y producción de metabolitos de interés (CONDA).

Un consorcio de investigadores ayudó a estandarizar medios de cultivo que sean aptos para la masificación de bacterias en cultivos líquidos. “International Streptomyces Project (ISP)” es una institución que ha aportado con investigaciones en medios de cultivo para que sean aptos para este tipo de experimentaciones (Pil, y otros, 2003).

1.8.1 Medio ISP2

Es un medio de cultivo líquido que favorece la fermentación, estimulando la producción de metabolitos secundarios, debido a su fuente rica en nutrientes (Egas & Tinajero, 2016). Está compuesto de extracto de levadura, formado mediante el autolisado de células de levaduras que aporta vitamina B, factores de crecimiento y algunos aminoácidos (Vargas, 2014). Contiene extracto de malta que proviene de la extracción en agua de malta de cebada y también aporta aminoácidos, carbohidratos y vitaminas. Además, posee dextrosa, que es fuente de hidratos de carbono (UNVIME, 2013).

1.8.2 Medio antibiótico N°5

Existen otros tipos de medios de cultivo que son útiles para pruebas de susceptibilidad de bacterias a antibióticos. Entre ellos está el medio antibiótico N°5, que es muy usado para métodos de cilindro para ensayos con *Streptomyces*. Está compuesto por peptona

de gelatina y extracto de carne, que van a proveer nitrógeno, minerales y aminoácidos esenciales. También se compone de extracto de levadura que aporta vitaminas del complejo B. Este medio es sólido y es muy usado para poder analizar el espectro de acción de un antibiótico, midiendo el diámetro de inhibición que éste pueda formar (CONDA).

Capítulo 2

2. Metodología

2.1 Muestras para identificación

Para el presente proyecto se utilizó muestras de suelo provenientes de la provincia de Pichincha, de la parroquia Conocoto, aisladas en las prácticas de laboratorio de Biotecnología Industrial del periodo 48 de la Universidad Politécnica Salesiana, las mismas que fueron sometidas a diferentes pruebas para el aislamiento e identificación de microorganismos con capacidad antibiótica.

2.2 Aislamiento de microorganismos del suelo

2.2.1 Factores de dilución

En un frasco de vidrio de borosilicato se preparó una suspensión que contiene 10 gramos de suelo con 90 mL de agua destilada. Se agitó a 110 RPM durante 1 hora a 30°C en un agitador marca TECNAL modelo TE-420 INCUBADORA. Se realizó una serie de diluciones, que van de 10^{-1} a 10^{-6} .

2.2.2 Siembra de las diluciones preparadas.

Según (Tobar, 2012) se utiliza el método de extensión en placa, el cual consiste en sembrar mediante un asa de Digralsky de cristal estéril, 1 mL de cada dilución en una caja Petri dispersando por toda la caja, luego se incuba durante 48 horas a 27 °C con el fin de obtener diferentes colonias separadas en la superficie del agar.

2.2.3 Selección de microorganismos

En esta etapa se pretende obtener cepas totalmente puras, entre las 24h y 48h de incubación, se selecciona las unidades formadoras de colonias (UFC) que han crecido en la superficie del agar con diferente morfología, tomando en cuenta que el número de UFC no supere 300 UFC. A continuación, se procede a sembrar las colonias en diferentes cajas Petri con la debida rotulación: PAP48G3 PA (Proyecto antibióticos), P (Pichincha), 48 (Período) G3 (Colonia).

2.3 Pruebas de antibiosis

2.3.1 Medios de cultivo para pruebas de antibiosis

2.3.1.1 Elaboración de agar nutriente

Este medio es usado para el conteo de aerobios totales y para el desarrollo de microorganismos generales. Para la preparación de 1000 mL de este medio, se pesaron 23 g de agar nutriente.

2.3.1.2 Elaboración del medio ISP2

Para la preparación de 1000 mL de medio de cultivo líquido ISP2, se pesaron 4.0 g de extracto de levadura, 4.0 g de dextrosa y 10.0 g de extracto de malta. Este medio es usado para sembrar la bacteria que tiene sustancias antibióticas, ya que favorece la producción de metabolitos secundarios.

2.3.1.3 Elaboración del medio antibiótico N°5

Para preparar 1000 mL de este medio se usaron 15.0 g de agar, 6.0 g de extracto de peptona de gelatina, 3.0 g de extracto de levadura y 1.5 g de extracto de carne. Este medio sirve para determinar el potencial antibiótico, colocando el microorganismo de interés en pequeños pocillos y midiendo los halos de inhibición formados.

2.3.2 Cepas productoras de antibióticos

Los microorganismos fueron sometidos a pruebas de antibiosis, para lo cual se utilizó cepas certificadas *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027). El primer paso es preparar 25 mL de medio TSB y con un asa estéril, agregar una colonia de una de las cepas certificadas. La turbidez de este medio debe ser igual a un estándar 0.5 McFarland (tabla 4). Después se dispensa medio de agar nutriente en cajas Petri y antes que gelifique, se agrega 1 mL de medio TSB que contiene a la cepa certificada. Luego se siembran las bacterias que puedan producir antibiosis (Egas & Tinajero, 2016). A continuación, se incuba por 24 horas a 37°C. Los microorganismos que tienen la capacidad de producir un halo de inhibición, evidencian la producción de antibióticos y con ellos se continúa la investigación.

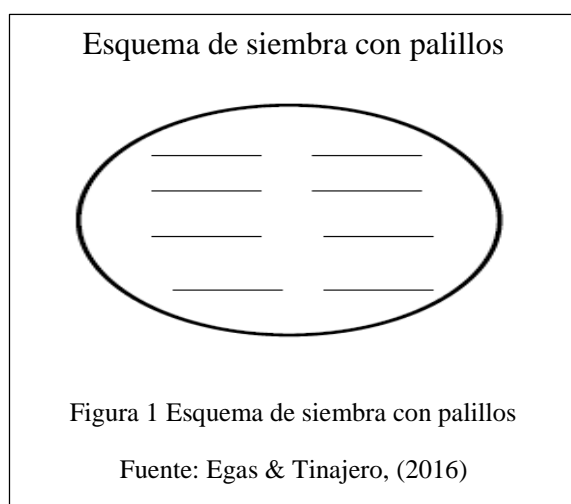


Tabla 1 Preparación de Estándares de McFarland

Estándar N°	Volumen (mL)		Equivalente en N° de bacterias/mL (x10 ⁸)
	BaCl ₂ (1.175%)	H ₂ SO ₄ (1%)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

Nota: Tomado de Mcfarland Turbidity Standard N°5

Fuente: (Becton & Company, 2005)

2.3.3 Aislamiento de microorganismos con capacidad antibiótica

Para esto se preparan cajas con medio de agar nutriente. Por medio de un asa bacteriológica se toma una muestra del microorganismo y se lo resiembró en una caja Petri. Se lo realiza repetidas veces hasta obtener el microorganismo totalmente aislado con el objetivo de tener colonias totalmente puras.

2.4 Cepario

Se preparó tubos pico flauta con agar Tripticasa soya agar (TSA); se tomó una asada y se procedió a sembrar en los tubos, luego se incubaron a 37°C por 24 horas con el fin de tener un respaldo de las cepas seleccionadas.

2.5 Identificación de microorganismos seleccionados.

En esta fase lo que se realiza es la caracterización fenotípica, tanto macroscópica como microscópica, de las cepas aisladas que demostraron tener capacidad antibiótica. Se realizan diferentes evaluaciones, que permiten conocer las características morfológicas de las bacterias seleccionadas, a través de pruebas tales como: tinción Gram, tinción de esporas y pruebas bioquímicas que permiten identificar al microorganismo de interés.

2.5.1 Pruebas macroscópicas

Se siguió la metodología de (Bailón, Cruz, & Cervantes, 2003). Los análisis se realizaron con colonias de 24 h de siembra. La evaluación se la hizo mediante inspección visual de las colonias que crecieron en la superficie de los medios de

cultivo. Durante la inspección, se tomaron las cajas Petri con las bacterias y se inclinaron en varias direcciones, con iluminación directa, para que la luz permita un mejor análisis desde diversos ángulos. De esta forma se analizaron tres aspectos: la forma, color, superficie y borde de las colonias bacterianas.

2.5.2 Tinción de Gram

Se sembraron las cepas aisladas y se incubaron durante 24 horas a 37°C, tal como lo describe la metodología de (Santambrosio, Ortega, & Garibaldi, 2009).

Con un asa estéril, se tomó una muestra de la caja Petri con la cepa aislada e inmediatamente se dispersó en un portaobjeto previamente lavado. Se colocó una gota de agua estéril para dispersar la muestra. Las células se fijaron al portaobjetos con la acción del calor del mechero y luego fueron teñidas con unas gotas de cristal violeta por un minuto. El colorante se retiró con agua destilada. Luego, se cubre el frotis con Lugol, dejando reposar por un minuto y se retiró con agua destilada. A continuación, se colocó unas gotas de alcohol cetona por 20 segundos, para posteriormente lavar con abundante agua destilada. Finalmente, se cubre el frotis con Safranina, dejando reposar por un minuto y se lavó con agua destilada. La muestra fue cubierta con un cubreobjetos, para ser observada en el microscopio con el lente aumento de 100X.

2.5.3 Tinción de esporas

Según (Villa, Fernández, & Castillo, 2012) este proceso también llamado “método de Schaeffer y Fulton”, consiste en tener un cultivo puro incubado por 24 horas. Se tomó una muestra de la cepa de interés y se hizo un frotis en el portaobjetos previamente

lavado y esterilizado con alcohol. Se colocó un pedazo de papel filtro encima del frotis y se aplicó el reactivo verde malaquita. Se calentó en un mechero hasta que emitiera vapores durante un minuto, evitando el secado del papel agregando más reactivo durante un minuto. Después de este proceso, se enfría la placa portaobjetos y se lava la muestra con abundante agua destilada, se aplicó unas gotas de safranina durante 15 segundos y se quitó el exceso de residuos de colorante con agua. Se retiró el papel filtro y mediante un cubreobjetos se observaron los resultados en el microscopio con un aumento de 100X.

2.5.4 Prueba de catalasas

Esta metodología es descrita por (Olmos, García, Sáez, & Valdezate, 2010) y se utilizaron cultivos de 24 horas. Se usa peróxido de hidrogeno al 3%, permitiendo que la enzima catalasa realice la descomposición del peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua. Se tomó un poco de muestra de las bacterias de interés y se hizo un frotis en un portaobjetos previamente lavado y esterilizado con alcohol. Se añadió unas gotas del peróxido de hidrógeno encima del frotis y se esperó entre 15 y 20 segundos. Si en el frotis se observa presencia de burbujas, el resultado de prueba de catalasa es positivo.

2.5.5 Prueba de oxidasa

Se utilizó la metodología descrita por (Perilla, y otros, 2003). Se usa un papel que contiene el reactivo N, N, N', N' –tetrametil-p-dihidroclorofenilendiamina y sirve para detectar si una bacteria posee un sistema de citocromooxidasa, que activa la activación del citocromo c en su cadena respiratoria.

Para este procedimiento, se coloca el papel con el reactivo de oxidasa en una caja Petri vacía y se lo humedece con dos gotas de agua destilada, después se toma una asada de la bacteria de interés, se coloca en el papel para prueba de oxidasa y se espera un minuto. Si el papel se tiñe de púrpura, el resultado es positivo.

2.5.6. Prueba de anaerobiosis

Para esta prueba se usaron tubos que contenían agar peptona al 2%, con las bacterias sembradas. Se colocaron estos tubos en una cámara de anaerobiosis a $23^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Trascurrido el período de incubación, se observó si existía crecimiento.

2.5.7 Prueba de Manitol

Esta prueba es muy usada en los laboratorios para la diferenciación de estafilococos y de bacterias que sean Gram positivas o negativas. Para esta prueba, se siguió la metodología de (Becton, Dickinson and Company, 2013), que consiste en usar el medio de “Agar Sal Manitol” que contiene rojo fenol para indicar si la bacteria es capaz de fermentar manitol. Además, posee una elevada concentración de cloruro de sodio que inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas.

Se prepararon cajas Petri con el medio Agar Sal Manitol, y con un asa estéril se sembraron las cepas de interés. Después de 24 horas de la siembra, se analizaron los resultados. Si el medio se torna de color amarillo, la bacteria es capaz de fermentar manitol. Si existe crecimiento normal de la bacteria, se puede deducir que es Gram positiva, por su capacidad de resistir altas concentraciones de cloruro de sodio.

2.5.8 Pruebas con kit de Identificación bioquímico.

2.5.8.1 BD BBL™ Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID Kit

Para el test se requiere un cultivo de cepas aisladas incubadas por 24 horas a 37°C. Con un asa bacteriológica estéril, se tomaron 2 asadas de las cepas de interés dentro de un vial que viene incluido en el kit, hasta que la turbidez sea equivalente a un estándar de McFarland 0.5. Se vertió el contenido del tubo en las bandejas de incubación del Kit, hasta que los pocillos sean llenados totalmente con el inóculo y se selló la muestra con las tapas del panel. Se lo colocó boca abajo en la incubadora durante 24 horas a 37°C. Pasado el tiempo requerido se realizó la lectura.

2.5.8.2 Microgen® BACILLUS-ID

Para la realización de esta prueba se necesita un cultivo puro de 24 horas a 37°C. Mediante un asa estéril se tomó una muestra de la cepa de interés y se colocó en un vial que viene incluido en el kit, hasta llegar a un estándar de turbidez Mc Farland de 2.0. Se añadió de 100 a 125µL de la suspensión bacteriana en los 24 pocillos. A continuación, para la reacción de arginina dehidrolasa se agregó 3 gotas de aceite mineral al pocillo 21. Luego se selló la bandeja de incubación con la tapa adhesiva, incubando a 30°C durante 24 horas. Al día siguiente se analizan los resultados de los pocillos (1-18) según el manual de uso y se volvió a incubar por 24 horas más. A las 48 horas de incubación para realizar la reacción bioquímica “Indol” se agrega 2 gotas de reactivo Kovacs al pocillo 19, y se analizan los resultados después de 60 segundos (rosado/rojo se considera positivo); en el pocillo 23 se agrega una gota del reactivo Voges Proskauer (VPI) y otra gota de (VPII) y se realiza la lectura de 15-30 minutos

(rojo/rosado se considera positivo en la prueba bioquímica Voges Proskauer). Para realizar la reacción de Nitrato, se agrega una gota del reactivo Nitrato A y una gota de Nitrato B en el pocillo 20, se realiza la lectura después de 60 segundos (rojo/rosado) positivo.

2.6 Producción de la sustancia antibiótica en condiciones de estrés

Para este proceso, se siguió la metodología realizada por (Egas & Tinajero, 2016).

Para la producción de la sustancia de interés, se necesita evaluar las condiciones óptimas del medio de cultivo en el que estarán las bacterias en condiciones de estrés. Se escogieron los medios más aptos para que el microorganismo de interés tenga todos los nutrientes necesarios, variando el pH y la salinidad, con el objetivo de producir la sustancia antibiótica.

2.6.2 Siembra del preinóculo variando la salinidad y pH.

Se prepararon 1000 mL de medio ISP2 y se colocaron 50 mL en 9 matraces Erlenmeyer de 250 mL. Después, se varió el pH y salinidad de cada medio. Se trabajó con valores de pH de: 6, 7 y 8. La salinidad se modificó, haciendo a los medios hipotónicos (0.6% de salinidad), isotónicos (0.9% de salinidad) e hipertónicos (1.2% de salinidad). Los matraces Erlenmeyer se taparon correctamente con tapones de algodón y se esterilizaron. Después, se inoculó en cada matraz 3 mL de preinóculo antes preparado en medio TSB y se incubaron en un agitador rotatorio a 150 rpm y a 30 °C. La producción de antibiótico se evaluó durante 10 días. El esquema de los tratamientos se explica en la tabla a continuación:

Tabla 2 Producción del antibiótico

<i>Nº Tratamiento</i>	pH	% salinidad
1	6	0.6
2	6	0.9
3	6	1.2
4	7	0.6
5	7	0.9
6	7	1.2
7	8	0.6
8	8	0.9
9	8	1.2

Elaborado por: Los autores, 2017

2.6.3 Método de perforación en placa

Cada día se tomaron 5 mL de los matraces con caldo de cultivo ISP2, con pH y salinidad modificados y se centrifugó a 3000 RPM durante 5 minutos.

En cajas con agar antibiótico N° 5, se inoculó 1 mL de *Bacillus spizizenii* o *Pseudomona aeruginosa* en cada caja. Cabe recordar que este medio es para evaluar el potencial antibiótico de la bacteria de interés. Posterior a este proceso, se hicieron pocillos redondos en los medios con la ayuda de pipetas Pasteur estériles.

Una vez que se solidificaron los medios en las cajas, se procedió a colocar 60 μ L de los medios centrifugados ISP2 con pH y salinidad modificados, en cada pocillo realizado en el medio antibiótico N°5. Finalmente se colocaron los medios en una incubadora a 30 °C durante un día, para evaluar el tamaño de los halos producidos por la sustancia antibiótica de las bacterias.

2.7 Análisis estadístico

Se aplicó el análisis de “Área bajo la curva del progreso de antibiosis” (ABCPA), para obtener información de la producción de antibiótico en los diferentes tratamientos, durante los 10 días. Con este método, se determinó la existencia de diferencias estadísticas entre los nueve tratamientos aplicados.

Para los análisis estadísticos de análisis de varianza, los datos se procesaron en el programa InfoStat “versión 2013”. Se desarrolló la prueba de Tukey al 5%, para encontrar diferencias significativas en la evaluación de tamaños de halos de inhibición de los diferentes tratamientos.

Capítulo 3

3. Resultados y discusión

3.1. Aislamiento de microorganismos del suelo

Las cepas fueron obtenidas de suelos de la Provincia de Pichincha, las cuales fueron aisladas y purificadas. El factor de dilución con el que se trabajó fue 10^{-6} , ya que según (Ortegón, 2009), este tipo de diluciones contienen una carga menor a 300UFC/g.

A las 24 horas, se pudo observar distintas colonias, las cuales fueron necesarias para el aislamiento. Los microorganismos fueron seleccionados según el borde, color, y forma de las colonias.

3.2. Pruebas de antibiosis

Se observó que la cepa PAP48G3 tuvo inhibición contra *Bacillus spizizenii* y *Pseudomona aeruginosa*, es decir, tiene capacidad de producir antibiótico de amplio espectro. Para determinar la antibiosis de los microorganismos, se hizo el análisis con la formación de halos de inhibición. Para no tener falsos positivos, se lo hizo por triplicado y se determinó que la cepa PAP48G3 produce un halo en todas las repeticiones.

3.3. Caracterización morfológica de los microorganismos.

La tinción Gram fue positiva y la forma observada fue de bacilo. La tinción de esporas también fue positiva. Se hizo el análisis morfológico de las colonias bacterianas aisladas, mediante inspección visual. Estas características pueden ser observadas en la

tabla 3. Según (Rivera, 2015) , la forma de las bacterias es determinada por la presencia de citoesqueletos, muros celulares y por su manera de pegarse en superficies. Estas formas determinan la capacidad de las bacterias de obtener nutrientes y poder sobrevivir en un medio.

Tabla 3 Caracterización morfológica de los microorganismos productores de antibióticos

Código	Borde	Color	Forma	Superficie	Tinción Gram	Tinción de Esporas
PAP48G3	Lobulado	Blanco	Circular	Convexa	Positivo	Positivo

Fuente: Los autores, 2017

La cepa PAP48G3 fue sometida a algunas pruebas bioquímicas para bacilos, que ayudaron a tener un conocimiento más amplio de las características propias de esta bacteria. Las pruebas de catalasa y manitol fueron positivas, mientras que la prueba de oxidasa fue negativa.

3.4. Pruebas con kits de Identificación bioquímica.

A la cepa PAP48G3 se le realizó una caracterización de pruebas bioquímicas. Mediante el Kit Microgen BACILLUS-ID se seleccionaron las siguientes pruebas:

Tabla 4 Características y pruebas bioquímicas para la cepa PAP48G3

Pruebas	Reacción	Positivo	Negativo
Arabinosa	+	Amarillo	Rojo
Celobiosa	+		
Inositol	-		
Manitol	+		
Manosa	-		
Rafinosa	-		
Ramnosa	-		
Silicio	+		
Sorbitol	-		
Sucrosa	+		
Trehalosa	+		
Xylosa	-	Amarillo	Rojo
Adonitol	-		
Galactosa	+		
Metil-D-Manosido	-		
Metil-D-Glucosido	-		
Inulina	-		
Melezitosa	-		
Indol	-	Rosado/Rojo	Incoloro/ Amarillo
ONPG	+	Amarillo	Incoloro

Arginina Dihidrolasa	+	Verde/ Azul	Amarillo /Verde
Utilización de citrato	+	Azul	Amarillo/Verde claro
Voges Proskauer	-	Rosado/Rojo	Color paja
Nitrato	-	Rojo	Incoloro / Amarillo

Fuente: Los autores, 2017

El Kit de identificación de 1 BD BBL™ Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID Kit que se realizó a la cepa PAP48G3, mostró un 99.09% de probabilidad que esta bacteria es *Bacillus megaterium*,

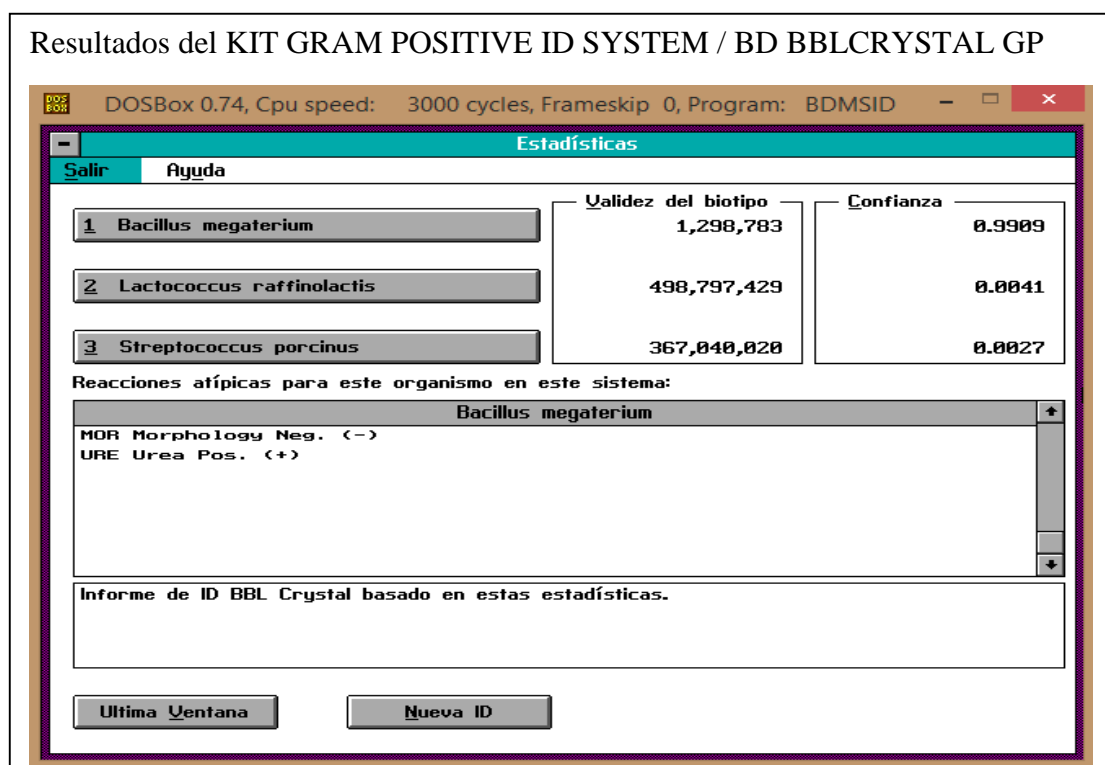
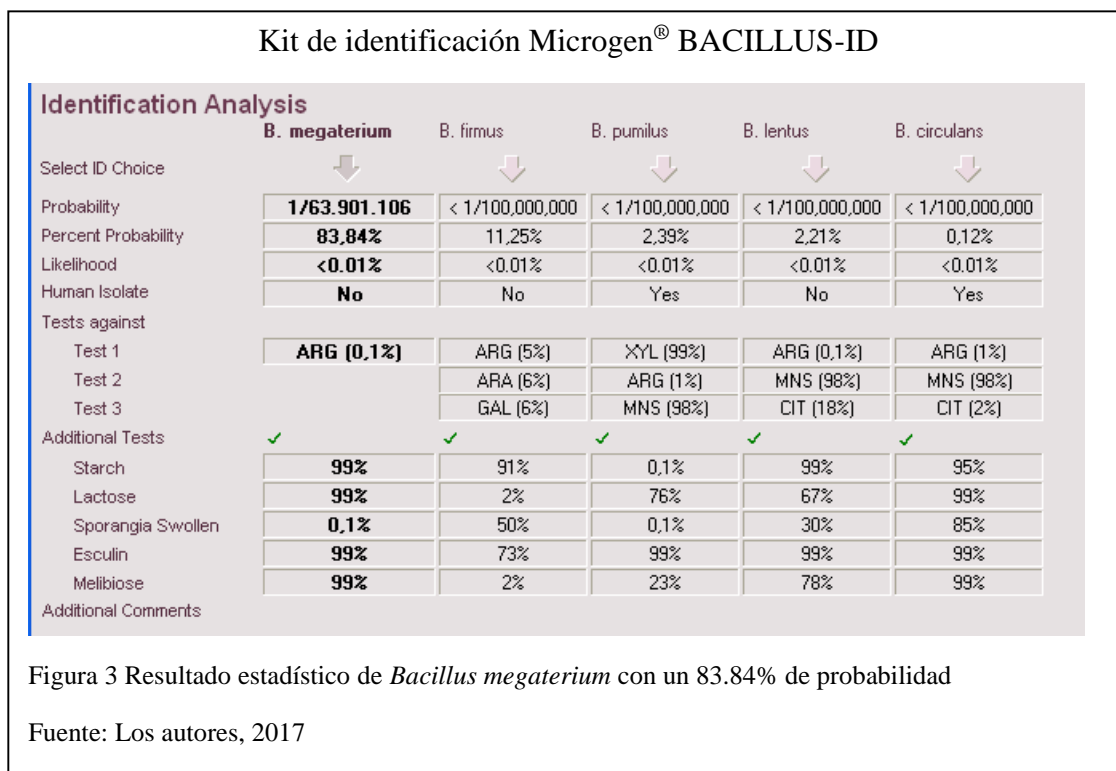


Figura 2 Resultado estadístico de *Bacillus megaterium* con un 99.09% de confianza

Fuente: Los autores, 2017

Mientras que con el Kit de identificación Microgen® BACILLUS-ID, también se menciona que es *Bacillus megaterium* con un 83.84% de probabilidad.



En un estudio realizado en *Bacillus megaterium* por (López, Pazos, Torres, & Casadesús, 2011), mencionan que esta bacteria es bacilo Gram positivo y catalasa positivo. En una investigación dirigida por (Liu & Jurtshuck, 1986), mencionan que se realizaron diferentes pruebas de oxidasas a 19 tipos de bacilos y *Bacillus megaterium* es oxidasa negativa, ya que carece de citocromo C, responsable de oxidar al NNN'N', tetrametil,1-4, fenilendiamina que da el color azul en la prueba de la oxidasa.

En la prueba de manitol, *Bacillus megaterium* creció sin problemas y la coloración del medio fue amarilla, por lo tanto, se confirma que es una bacteria Gram positiva (Becton, Dickinson and Company, 2013).

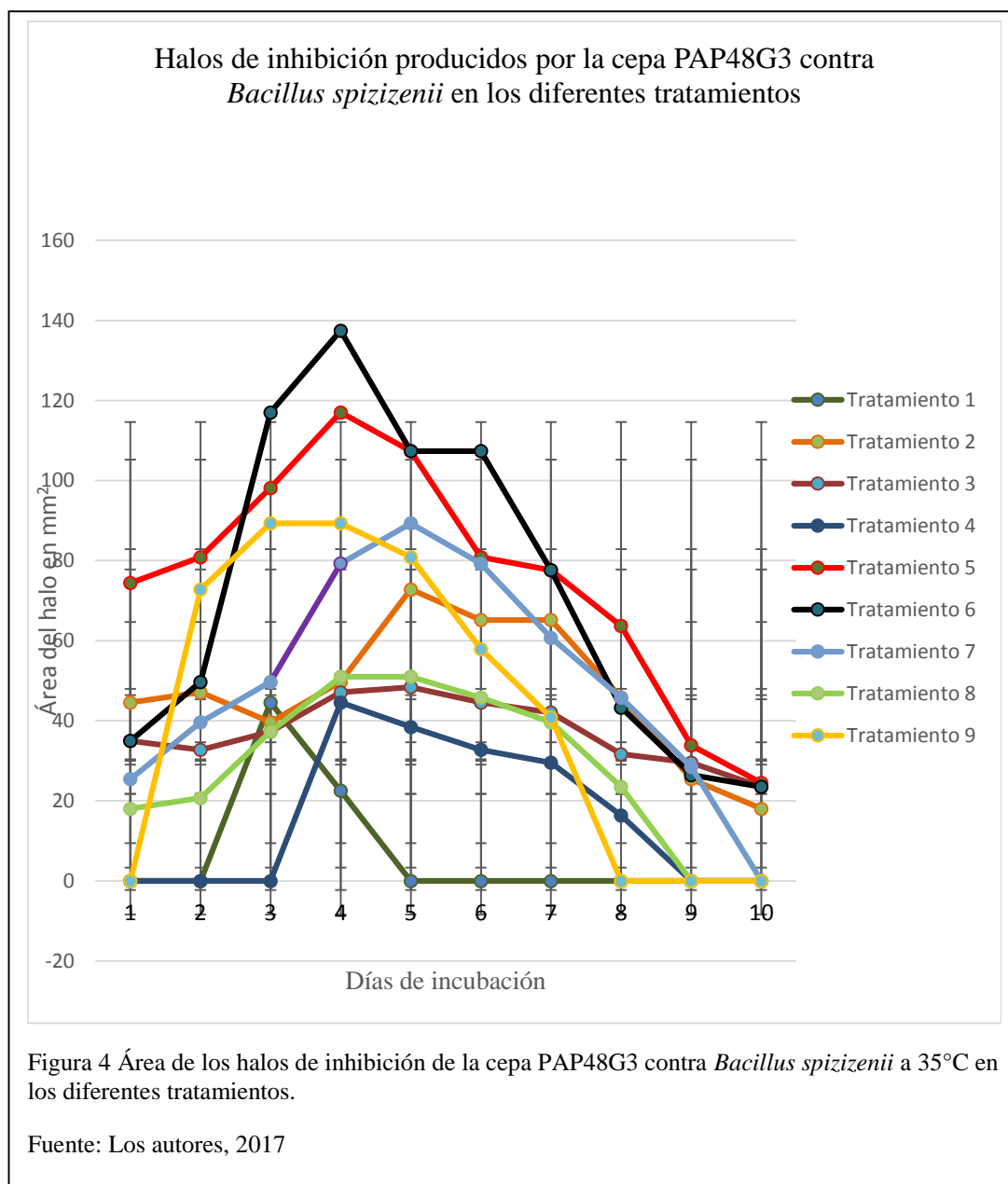
Según (MoBiTec GmbH, 2012), *Bacillus megaterium* ha sido considerado como un microorganismo muy importante durante décadas. Esta bacteria es capaz de producir “Penicilina amidasa”, que es usada para producir penicilina sintética. Además, produce amilasas que son útiles en industrias de panificación y glucosa deshidrogenasa, que es útil en análisis de glucosa en sangre. También es usada para la producción de vitamina B12, piruvato y, además, tiene enzimas que pueden modificar corticosteroides y deshidrogenasas de aminoácidos.

3.5 Evaluación de la producción de antibiótico en condiciones de estrés

La presencia de la sustancia antibiótica en el caldo de cultivo ISP2 fue evaluada durante 10 días, en condiciones de estrés de pH y salinidad, con la medición del tamaño de los halos de inhibición formados en el medio antibiótico N°5 que contenían *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) o *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027). En las figuras 4 y 5, se puede observar que la bacteria PAP48G3 produce mayor actividad antimicrobiana contra *Bacillus spizizenii* en el día 3, en condiciones de estrés de pH 7 y 1.2% de salinidad. Mientras que contra *Pseudomona aeruginosa*, la bacteria produce mayor actividad antimicrobiana en el día 4, en condiciones de estrés de pH 7 y 1.2% de salinidad.

Según (Yépes, 2010), los metabolitos secundarios de una bacteria se sintetizan al final de la fase de crecimiento exponencial o también en la fase estacionaria. Las condiciones de estrés provocan variaciones en el tiempo de estas fases, produciendo diferentes cantidades de metabolitos con estructuras químicas y actividades biológicas muy diversas, a lo largo de su ciclo biológico. En otra investigación realizada por (Botas, 2013), menciona que, en condiciones de estrés, las células bacterianas

canalizan sus recursos energéticos hacia la búsqueda de diferentes nutrientes, para poder adaptarse a los cambios que ocurren en el ambiente, enviando señales intracelulares que regulan la producción de metabolitos secundarios.



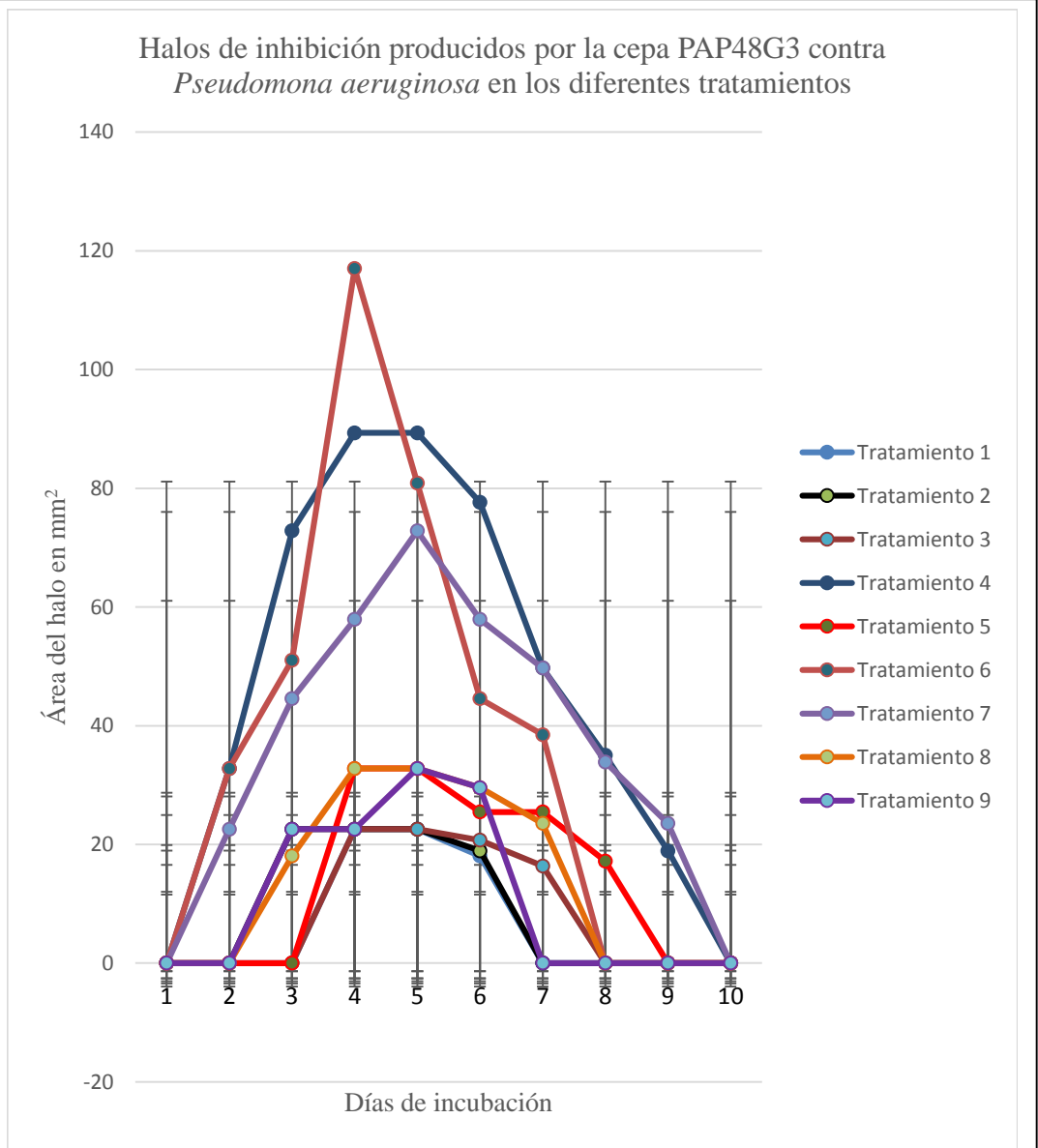


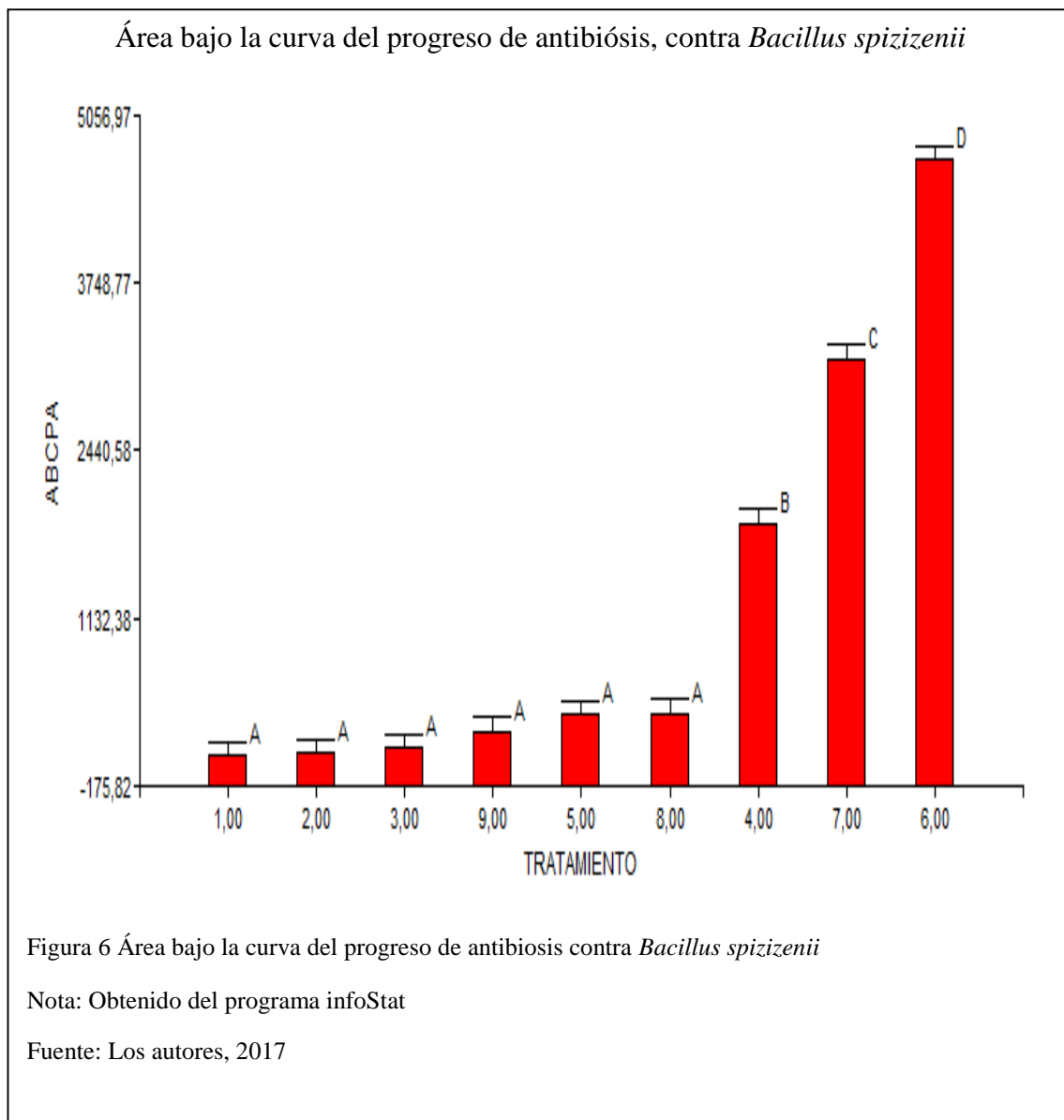
Figura 5 Área de los halos de inhibición de la cepa PAP48G3 contra *Pseudomona aeruginosa* a 35 °C en los diferentes tratamientos

Fuente: Los autores, 2017

3.6 Análisis del Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis (ABCPA) por tratamientos. Prueba de Tukey (5%)

3.6.1 ABCPA en *Bacillus spizizenii*

Al momento de realizar el análisis de los nueve tratamientos en el programa InfoStat, calculando el ABCPA, se puede observar que existieron cuatro rangos de significancia (A), (B), (C) y (D) entre los nueve tratamientos, como se puede ver en la Figura 6 de la prueba de Tukey (5%). En el rango A, se encuentran los tratamientos: 1 (promedio de ABCPA: 60.34), el tratamiento 2 (promedio de ABCPA: 79.35), el tratamiento 3 (promedio de ABCPA: 118.17), el tratamiento 5 (promedio de ABCPA: 370.60), el tratamiento 8 (promedio de ABCPA: 392.08) y tratamiento 9 (promedio de ABCPA: 243.37). El rango A es el que menos eficacia muestra en la acción de producir halos de inhibición. En el rango B, se encuentra el tratamiento 4 (promedio de ABCPA: 1867.69). En el rango C, está el tratamiento 7 (promedio de ABCPA: 3153.59), siendo también un buen tratamiento para producir sustancias antibióticas contra *Bacillus spizizenii*. Pero el mejor rango es el D, es decir, el tratamiento 6 (pH 7 y salinidad 1.2%), con un promedio de ABCPA: 4700.60, demostrando tener las mejores condiciones para producir sustancias de interés.

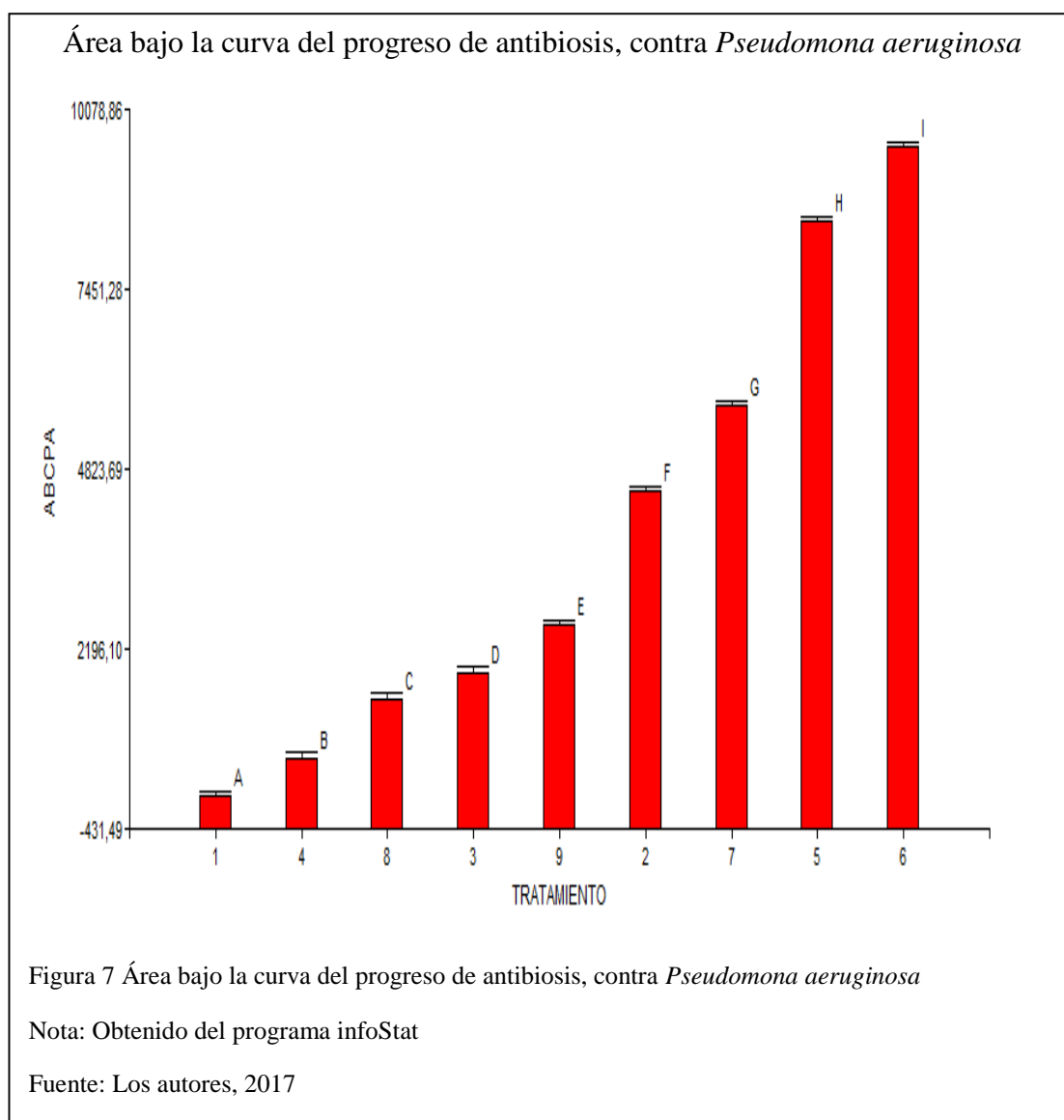


3.6.2 ABCPA en *Pseudomona aeruginosa*

Se identificaron 9 rangos de significancia (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G), (H), (I), como se puede observar en la Figura 7 de la prueba de Tukey (5%). Se puede deducir que ninguno de los nueve tratamientos realizados contra *Pseudomona aeruginosa* tiene relación significativa. Los rangos A (tratamiento 1), B (tratamiento 4), C (tratamiento 8), D (tratamiento 3), y E (tratamiento 9), tienen un ABCPA muy bajo; es decir, no tienen un buen rendimiento al producir halos de inhibición. Los rangos F (tratamiento

2) y G (tratamiento 7), tienen un rendimiento medio. Los mejores rangos son H (tratamiento 5), con un promedio de ABCPA de 8544.97 y el rango I (tratamiento 6), con un promedio de ABCPA de 9640.97.

Según (Velarde, 2007), los metabolitos secundarios producidos en diferentes condiciones de estrés, no tendrán el mismo espectro de acción, debido a la capacidad de la bacteria de adaptarse y producir diferentes elementos iónicos que le den tolerancia, para poder sobrevivir en un medio de estrés.



Conclusiones

De las cepas que se aislaron en la parroquia de Conocoto, de la provincia de Pichincha, la bacteria (PAP48G3) produjo sustancias antibióticas de amplio espectro contra, *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) y contra *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633).

Se confirmó que la bacteria PAP48G3 es un bacilo Gram positivo y formador de esporas, al realizar la caracterización morfológica, coloración Gram y tinción de esporas.

Se concluye mediante el kit Microgen[®] BACILLUS-ID, que la bacteria PAP48G3 que es *Bacillus megaterium*, con un 83.84% de probabilidad. Y con el Kit 1 BD BBL[™] Crystal[™] Identification Systems Gram-Positive ID, se reconfirma que es *Bacillus megaterium*, con una probabilidad del 99.09%.

La bacteria PAP48G3 produjo mayor actividad antimicrobiana contra *Bacillus spizizenii* en el día 4 en condiciones de estrés de pH 7 y 1.2% de salinidad. Contra *Pseudomona aeruginosa*, la bacteria produjo mayor actividad antimicrobiana en el día 3 en condiciones de estrés de pH 7 y 1.2% de salinidad.

Al realizar el análisis estadístico con InfoStat, se concluyó que el tratamiento 7 (pH 8 y salinidad 0.6%), con un promedio de ABCPA de 3153.59 y el tratamiento 6 (pH 7 y salinidad 1.2%), con un promedio de ABCPA: 4700.60, son los mejores para producir sustancias antibióticas contra *Bacillus spizizenii*. El tratamiento 5 (pH 7 y salinidad 0.9%), con un promedio de ABCPA de 8544.97 y el tratamiento 6 (pH 7 y salinidad 1.2%), con un promedio de ABCPA de 9640.97, son los mejores contra *Pseudomona aeruginosa*,

Recomendaciones

Es necesaria la búsqueda de bacterias productoras de antibióticos, en diversos lugares tales como: sedimentos de mares, suelos acidificados o alcalinos, ya que se podrían encontrar cepas que podrían producir nuevas sustancias antibióticas muy eficaces.

Se recomienda manejar otras variables para analizar en qué condiciones se produce más sustancia antibiótica. Por ejemplo, variando la temperatura de crecimiento, o también probando diferentes medios de cultivo al ISP2, como, por ejemplo: el caldo de sal de arginina y glicerol, medio R5, caldo de caseína o el caldo de nitrato de caseína.

Se aconseja llevar a cabo más pruebas de evaluación de la actividad antibiótica utilizando un biorreactor, con la bacteria PAP48G3, para poder conseguir mayor cantidad de sustancias antibióticas.

Se sugiere realizar pruebas de carácter genético, como por ejemplo el análisis de PCR y secuenciación, a la cepa PAP48G3, con el objetivo de confirmar el género y especie de las bacterias de interés.

Referencias

- Acosta, L. (2014). *Determinar la resistencia antimicrobiana de las enterobacterias y el uso de antibióticos en pacientes de UCI de la clínica D.A.M.E*, 12. Riobamba, Chimborazo, Ecuador. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de [http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/3890/1/56T00499%20UDC TFC.pdf](http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/3890/1/56T00499%20UDC%20TFC.pdf)
- Aquiahuatl, M., Volke, T., Prado, L., Shirai, K., Ramires, F., & Salazar, M. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología general*. 29. México. Recuperado el 30 de Septiembre de 2017, de http://www.izt.uam.mx/ceu/publicaciones/MMBG/files/manual_microbiologia_general.pdf
- ArgenBio. (2007). Recuperado el 17 de noviembre de 2017, de Microorganismos productores de antibióticos: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=237>
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). *Metabolismo secundario*. RE.
- Bailón, L., Cruz, R., & Cervantes, A. (2003). *Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias*, 31-34. México, México. Recuperado el 30 de octubre de 2017, de <https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf>
- Basualdo, J., & Coto, C. (2007). *Antibióticos y Antimicrobianos*. Chaco.
- Bathia, S. C. (2005). *Textbook of Biotechnology*. Dehli, India: Atlantic. Recuperado el 13 de noviembre de 2017
- Becton, D., & Company, A. (2005). *McFarland Turbidity Standard N°5*. España.

- Becton, Dickinson and Company. (Abril de 2013). *NSTRUCCIONES DE USO – MEDIOS EN PLACA LISTOS PARA USAR. BD Mannitol Salt Agar* . Recuperado el 20 de noviembre de 2017, de <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>
- Bermúdez, S. (24 de Enero de 2008). *Técnicas de siembra*.
- Borraz, C. (mayo de 2006). Tesis Doctoral. *Epidemiología de la resistencia a Meticilina, en cepas de Staphylococcus aureus aisladas en hospitales españoles.*, 5-6. Barcelona, España. Recuperado el 16 de diciembre de 2017, de http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2513/CBO_TESIS_DOCTORAL.pdf
- Botas, A. (2013). Doctora. *“Regulación del metabolismo en Streptomyces: Control por ArgR*, 22. León, España. Recuperado el 26 de noviembre de 2017, de https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3273/tesis_4cbfc3.PDF
- Chandrashekhara, S. (February de 2010). Doctor. *Isolation and Characterization of antibiotic production from soil isolates by fermentation*. Salem, India. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de http://www.academia.edu/2233125/Studies_on_Isolation_and_Characterization_of_Antibiotic_Producing_Microorganisms_from_Industrial_Waste_Soil_Sample
- Chaparro, A. (2010). *Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de Mucor circinelloides y evaluación de su actividad antimicrobiana*. Bogotá.

CONDA. (s.f.). *Pruebas para susceptibilidad de bacterias a antibióticos (PSA)*.

Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de http://www.condalab.com/pdf/Antibiotic_Susceptability_Test_esp_new.pdf

Coronel, J. (Abril de 2014). *Caracterización fitoquímica y evaluación de actividad antimicrobiana y antioxidante de Dentrophthora elíptica (Gradner) Krug y Urb (Santalaceae)*, 14. Quito, Pichincha, Ecuador. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6620/1/UPS-QT05106.pdf>

Díaz, R., & Gamazo, C. (2005). MANUAL PRACTICO DE MICROBIOLOGIA. *Tercera*. MASSON. Recuperado el 30 de Septiembre de 2017

Egas, C., & Tinajero, M. (marzo de 2016). Ingenieras en Biotecnología de los RRNN. *Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales del Ecuador*, 38-41. Quito, Pichincha, Ecuador. Recuperado el 30 de octubre de 2017, de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12142/1/UPS-QT09705.pdf>

Espinel, S. (Marzo de 2016). Evaluación de la capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico por parte de Actinomycetos aislados de muestras de suelos de las provincias de Pichincha y Morona Santiago. 22. Quito, Pichincha, Ecuador. Recuperado el 30 de Septiembre de 2017, de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12143/1/UPS-QT09663.pdf>

Fernandez, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2010). Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. 4. España. Recuperado el 30 de Septiembre de 2017, de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

- García, C., & Hernández, T. (2004). *Importancia de la medida de la actividad microbiana en suelos y materiales orgánicos*. Murcia: soilACE.
- García, F. (1 de Noviembre de 2011). *Microbiología del suelo*. Recuperado el 10 de Diciembre de 2017, de http://www.florgarcia.com/wp-content/uploads/2011/11/MICROBIOLOGIA_DEL_SUELO.pdf
- González, A., Basílico, J. C., & Sarsotti, P. (1997). *Introducción al estudio de la Micología*. Santa Fé: UNL. Recuperado el 20 de Octubre de 2017
- Guimaraes, L., Araujo, R., Garrido, L., Ventura, A., Padilla, G., & Facciotti, M. (2004). *Effect of pH on the production of the antitumor antibiotic retamycin by Streptomyces olindensis*, 107. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1042/BA20030166/epdf?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=www.ncbi.nlm.nih.gov&purchase_site_license=LICENSE_DENIED
- Hassan, M., El-Naggar, M., & Said, W. (2001). *Egyptian Journal of Biology*, 3, 1-10. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de http://ecology.nottingham.ac.uk/~plzfg/EBBSoc/ejb3/botany/Hassan_et_al_2001.pdf
- Herrera, M. (Enero de 1999). *Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de laboratorio*. San José. Recuperado el 30 de Septiembre de 2017, de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010
- Herrera, M. (Enero de 2004). Interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana . *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 39(1). Recuperado el 30 de Septiembre de 2017, de

http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462004000100007

Korolkovas, A., & Burckhalter, J. (2003). *Compendio esencial de Química farmacéutica*. Bogotá: Reverte, S.A.

Krulwich, T., Sachs, G., & Padan, E. (29 de Diciembre de 2011). *Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis*. doi:10.1038/nrmicro2549

Liu, J. K., & Jurtshuck, P. (enero de 1986). N,N,N'-N'-Tetramethyl-~Phenylenediamine-Dependent Cytochrome Oxidase Analyses of Bacillus Species. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, 36(1), 38-46. Recuperado el 20 de noviembre de 2017, de <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/36/1/ijis-36-1-38.pdf?expires=1511205538&id=id&accname=guest&checksum=FEE06AA0AA0CDE966B862A8F6840ED84>

López, S., Pazos, V., Torres, D., & Casadesús, L. (enero de 2011). *Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género Bacillus promisorios para el control de Rhizoctonia solani Kühn y Sclerotium rolfsii Sacc.* Habana, Cuba. Recuperado el 20 de noviembre de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1562-30092011000100006&script=sci_arttext&tlng=pt

Maganhotto, C., & Francisconi, E. (Enero de 2012). *Effect of Salinity on Soil Microorganisms*. Brasil. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de <http://cdn.intechopen.com/pdfs/25277.pdf>

Mateos, P. (1981). *Aislamiento y selección de microorganismos industriales*.

Mateos, P. (2005). *AGENTES ANTIMICROBIANOS Y MICROORGANISMOS*. Universidad de Salamanca.

- Michel, A. (Noviembre de 2001). Doctor en Ciencias. *Cepas nativas de Trichoderma spp euascoycetes: (Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre Fusarium subglutinans y F. Oxysporum (Hyphomycetes:Hyphales)*. Colima, México. Recuperado el 30 de Septiembre de 2017, de http://digeset.uco.mx/tesis_posgrado/Pdf/Alejandro%20Casimiro%20Michel%20Aceves.PDF
- Millar, M. (octubre de 2013). *ANTIBIOTICS AND ANTIBIOTIC RESISTANCE: WHAT DO WE OWE TO EACH OTHER?*, 11-12. Birmingham, Reino Unido. Recuperado el 13 de noviembre de 2017, de <http://etheses.bham.ac.uk/4780/1/Millar14PhD.pdf>
- MoBiTec GmbH. (2012). Recuperado el 25 de noviembre de 2017, de Bacillus megaterium. Protein Production System: <https://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/MOB/BMEG02.pdf>
- Molina, J. (2011). *Clasificación de los antibióticos*. Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Microbiología y Parasitología. UNAM.
- Montero, M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa multirresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos*, 9. Barcelona, España. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/107902/mmm1de1.pdf?sequence>
- Ñacato, C., & Valencia, M. (Marzo de 2016). *Aislamiento, Identificación y Pruebas in vitro de cepas autóctonas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de Alternaria spp en Brassica oleraceae var. italica*, 15. Quito, Pichincha, Ecuador. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12144/1/UPS-QT09671.pdf>

- Olmos, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología*. Recuperado el 30 de octubre de 2017, de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (30 de abril de 2014). *El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo*. Ginebra. Recuperado el 13 de noviembre de 2017, de http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=907:el-primer-informe-mundial-de-la-oms-sobre-la-resistencia-a-los-antibioticos-pone-de-manifiesto-una-grave-amenaza-para-la-salud-publica-en-todo-el-mundo&Itemid=504
- Ortegón, A. (2009). *Técnicas para el aislamiento microbiológico*.
- Pérez, D. (22 de Diciembre de 2016). *Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria*. Obtenido de <http://www.mspsi.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
- Perilla, M., Ajello, G., Bopp, C., Elliott, J., Facklam, R., Knapp, J., . . . Dowell, S. (2003). *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo*. Recuperado el 25 de noviembre de 2017, de http://www.who.int/drugresistance/infosharing/WHO-CDS_CSR_RMD_2003_6_Manual_Laboratorio.pdf

- Pil, Y., Tomoda, H., Izima, K., Fukuda, T., Matsumoto, A., Takahashi, Y., & Omura, S. (Mayo de 2003). *The Journal of antibiotics*, 56(5), 448-453. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/56/5/56_5_448/_pdf
- Ramirez, L., & Marin, D. (agosto de 2009). *METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL*, 263-268. Pereira, Colombia. Recuperado el 10 de diciembre de 2017
- Ripa, A., Nikkon, F., Zaman, S., & Khondkar, P. (30 de Septiembre de 2009). *Optimal Conditions for Antimicrobial Metabolites Production from a New Streptomyces sp. RUPA-08PR Isolated from Bangladeshi Soil*. Bangladesh. doi:10.4489/MYCO.2009.37.3.211
- Rivera, L. (2015). *Microbiología. Interiorización del Conocimiento de Forma Significativa y Comprensiva, Primera*, 49. Machala, El Oro, Ecuador. Recuperado el 25 de noviembre de 2017
- Robles, Á. (s.f.). *USO DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS Y SUSTANCIAS NATURALES COMO UNA ALTERNATIVA ECOLÓGICA EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN CULTIVOS*. Loja, Ecuador. Recuperado el 30 de Septiembre de 2017, de http://unl.edu.ec/sites/default/files/investigacion/revistas/2014-9-6/5_articulo_de_revision_34-43_b1.pdf
- Rosas, S. (2015). Bióloga. *DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN COLORANTES NATURALES -Dactylopius coccus (COCHINILLA) EMPLEADOS EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS, DICIEMBRE 2014- FEBRERO 2015.*, 19. Arequipa, Perú. Recuperado el 10

de diciembre de 2017, de
<http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/438/M-21655.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. (2009). *Tinción y observación de microorganismos*. Recuperado el 30 de Septiembre de 2017, de https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf

Sethi, S., Kumar, R., & Gupta, S. (2017). *ANTIBIOTIC PRODUCTION BY MICROBES ISOLATED FROM SOIL*. Rajasthan, India. Recuperado el 13 de noviembre de 2017, de <http://ijpsr.com/bft-article/antibiotic-production-by-microbes-isolated-from-soil/?view=fulltext>

Tobar, F. (2012). *Técnicas y métodos de aislamiento y selección de microorganismos*. conalep.

UNVIME. (2013). *Medios de cultivo- Obtención y preparación de muestras*. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de <http://microagroalimunvime.wikispaces.com/file/view/Medios+de+Cultivo+%28ANEXO+I+TPN%C2%BA+2%29.pdf>

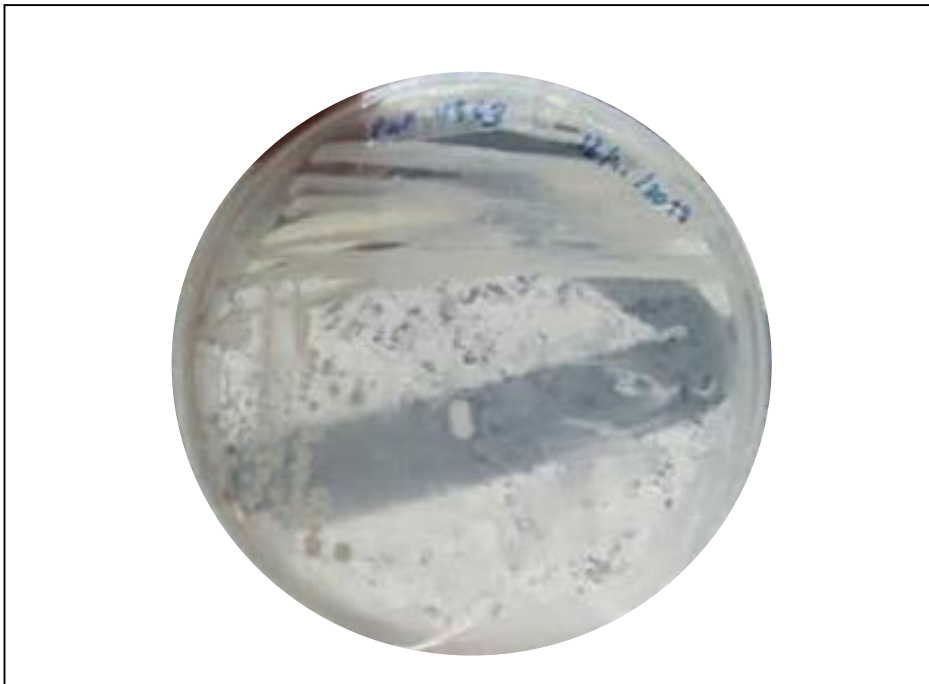
Van der Helm, A. (octubre de 2013). *An Overview of Alternatives for Conventional Antibiotics*. Recuperado el 13 de noviembre de 2017

Varela, C. (2008). Bacterióloga. *Comparación de la resistencia al tratamiento de infecciones urinarias no complicadas a nivel internacional, con historias clínicas del servicio de urgencias del Hospital San Ignacio del año 2007*, 48. Bogotá, Colombia. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis189.pdf>

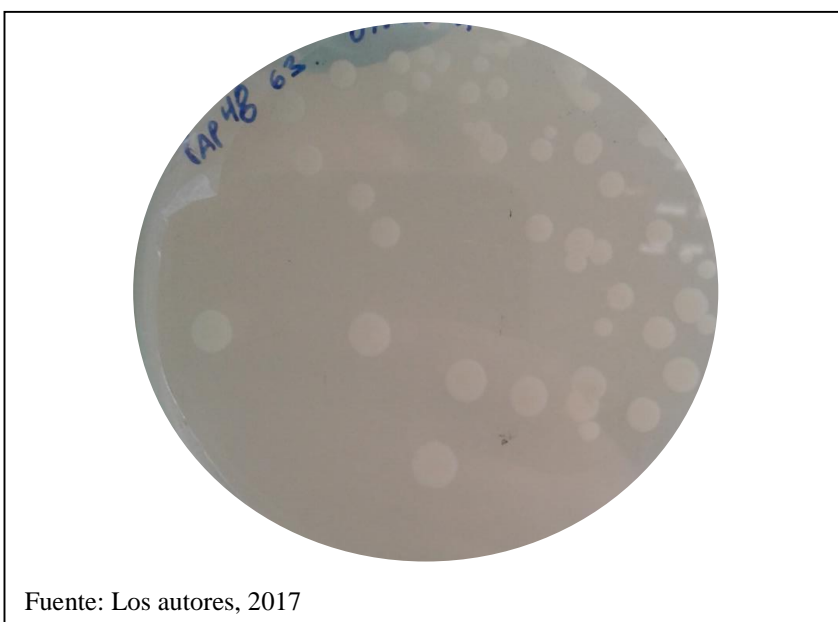
- Varela, G. (2 de Junio de 2015). *Fisiología y metabolismo bacteriano*. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2011.pdf>
- Vargas, C. (11 de Marzo de 2014). *Cultivo axénico*. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de <http://bioquimicamicro.blogspot.com/2014/03/>
- Vignoli, S. (2015). *Principales grupos de antibióticos*.
- Villa, M., Fernández, E., & Castillo, C. (2012). *Bacteriología y Micología veterinaria. Manual de prácticas de Laboratorio*, 28-32. Tecamachalco, Ecuador. Recuperado el 30 de octubre de 2017, de <http://files.gerardo-castillo.webnode.mx/200000059-1ad5b1bc4c/MANUALBACTERMUM.pdf>
- Volke, T., & Lilia, P. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio de microbiología*. México.
- Yan, N. (Abril de 2014). Doctor. *Response of microbial activity and biomass to changes in soil salinity and water content*, 9. Adelaide, Australia. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440/92660/3/02whole.pdf>
- Yépes, A. (2010). Doctora. *Sistemas de dos componentes y regulación de la producción de antibióticos en Streptomyces coelicolor*, 10-12. Salamanca, España. Recuperado el 26 de noviembre de 2017
- Zambrano, D. (Marzo de 2013). AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS DEGRADADORES DE MATERIA ORGÁNICA FIBROSA. 7. Calceta. Recuperado el 9 de Septiembre de 2017, de <http://repositorio.espana.edu.ec/bitstream/42000/30/1/Zambrano%20Pazmi%20C3%B1o%20Diego%20Efr%C3%A9n.pdf>

Anexos

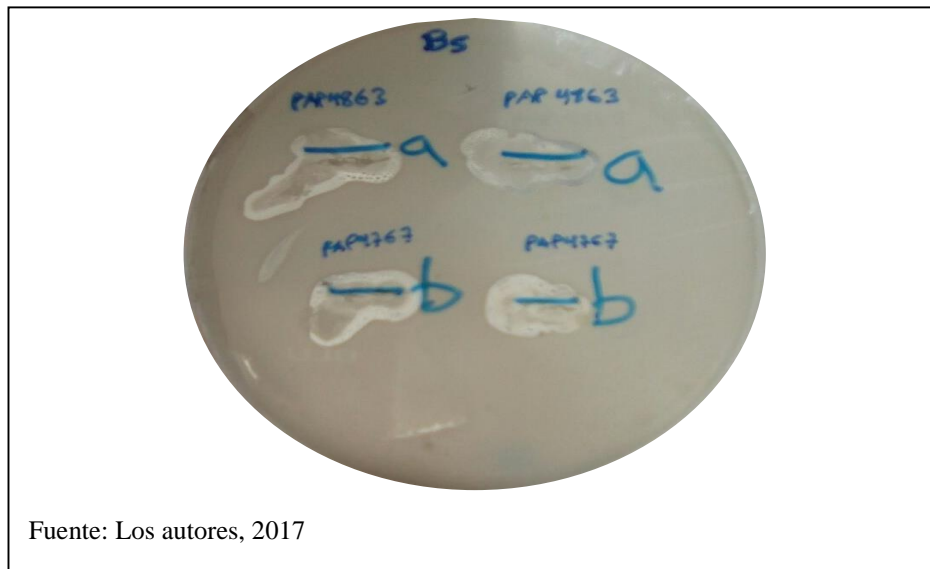
Anexo 1 Ceba PAP48G3 en Agar Nutriente



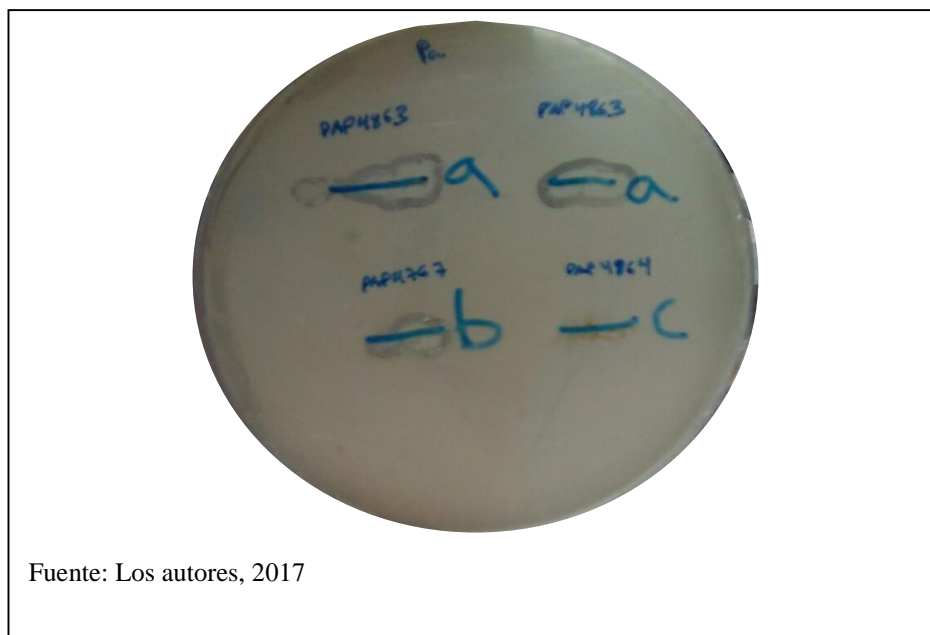
Anexo 2 Colonias aisladas de la cepa PAP48G3 en Agar Nutriente



Anexo 3 Prueba de antibiosis contra *Bacillus spzzizenii*



Anexo 4 Prueba de antibiosis contra *Pseudomona aeruginosa*



Anexo 5 Tratamientos con pH y salinidad variable



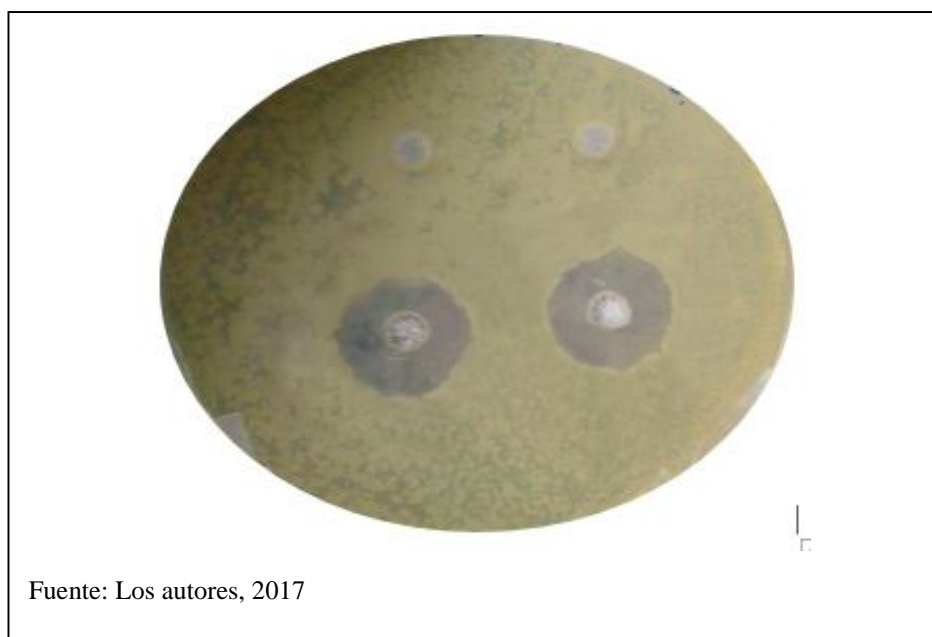
Fuente: Los autores, 2017

Anexo 6 Método de perforación en placa. Inhibición de *Bacillus megaterium* contra *Bacillus spzzizenii* en el día 4 con 1,2% de salinidad y pH=7

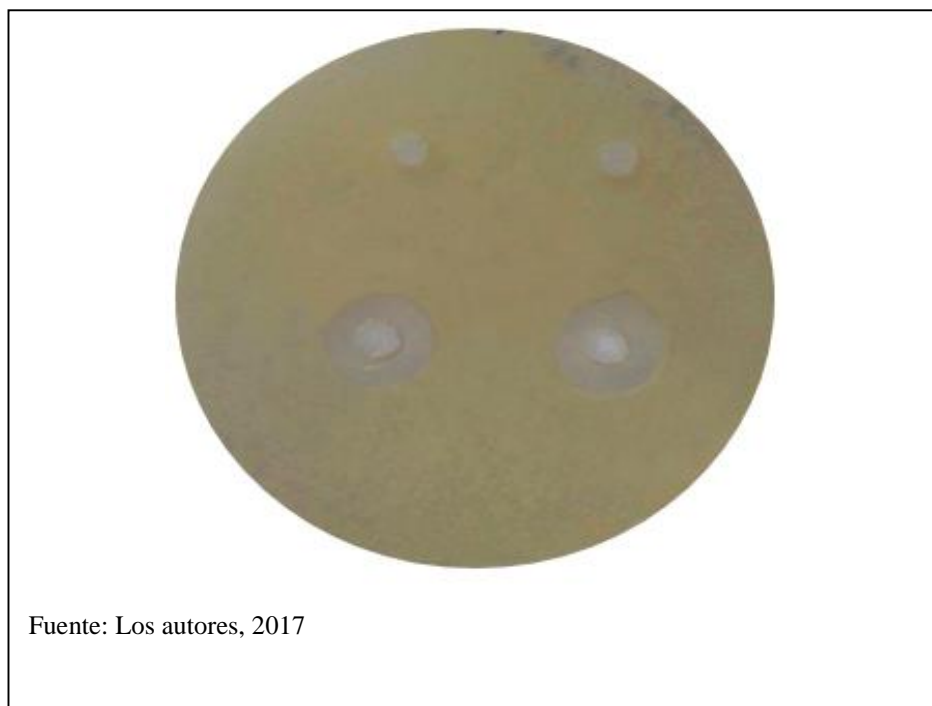


Fuente: Los autores, 2017

Anexo 7 Método de perforación en placa. Inhibición de *Bacillus megaterium* contra *Bacillus spzzizenii* en el día 3 con 1,2% de salinidad y pH=7



Anexo 8 Método de perforación en placa. Inhibición de *Bacillus megaterium* contra *Bacillus spzzizenii* en el día 4 con 0,7% de salinidad y pH=7.

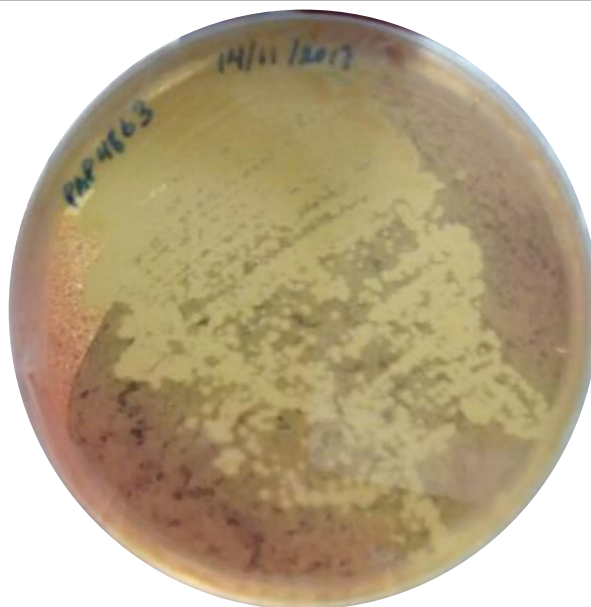


Anexo 9 Prueba de catalasa positiva



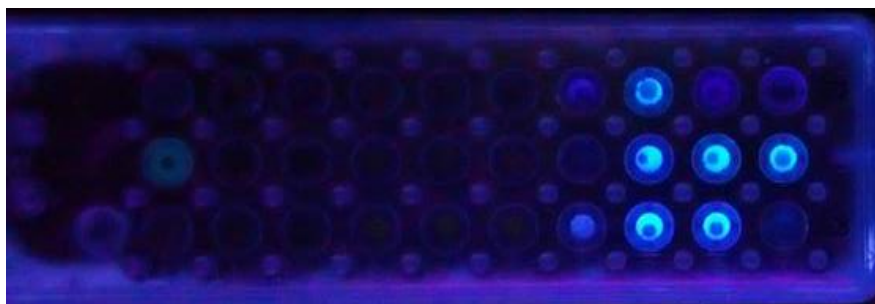
Fuente: Los autores, 2017

Anexo 10 Prueba de Manitol positiva



Fuente: Los autores, 2017

Anexo 11 kit BD BBL CRYSTAL revelado bajo luz UV



Fuente: Los autores, 2017

Anexo 12 kit BD BBL CRYSTAL Lectura del kit a las 24 horas



Fuente: Los autores, 2017

Anexo 13 Código resultante del kit BD BBL CRYSTAL

BD BBLCRYSTAL™
Gram-Positive ID System / BD BBLCRYSTAL GP 同定検査試薬

Reference # / 参照番号: 4863
Provenumner / Provi nr. / N° d'examen / Proben-Nr. / N. campione / Numer próbki /
N° da Amostra / Číslo vzorky / N° de muestra / Provenumner

Source/Site / 検体採取部位: 12
Provens kilde / Provi pärtolu / Zone de prélèvement / Probe Entnahmestelle / Provenienza
campione / Zdroj próbki / Origen da Amostra / Zdroj vzorky / Fuente de la muestra /
Provkälla

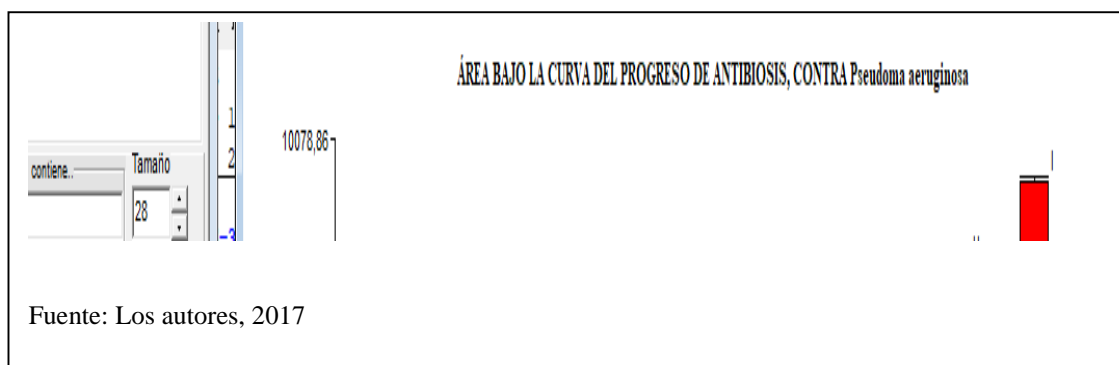
LOT: 12

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
4	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+ Bacilli
	FCT	FPH	FTR	FHO	TRE	SUC	ARA	BGL	PHO	URE	
2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+ Cocci
	FGC	FGS	FAR	FGN	LAC	MNT	GLR	PCE	PAM	ESC	
1	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	
	FVA	FPY	FGA	FIS	MAB	MTT	FRU	PLN	PGO	ARG	

/ N°
番号: 2 6 7 4 4 6 3 6 7 7

Fuente: Los autores, 2017

Anexo 14 Resultados de las Pruebas realizadas con el kit Microgen Bacillus ID



Anexo 15 Tinción Gram PAP48G3 100x

